

Université de Montréal

**Encapsulation de *Dehalococcoides* : avantage pour la  
déhalogénéation des solvants chlorés en sites contaminés**

par

Samuel Fournier St-Laurent

Département de Microbiologie et Immunologie

Faculté de médecine

Présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise  
en Microbiologie et Immunologie

Janvier, 2009

© Samuel Fournier St-Laurent, 2009

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Encapsulation de *Dehalococcoides* : avantage pour la  
déhalogénéation des solvants chlorés en sites contaminés**

présenté par :

Samuel Fournier St-Laurent

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Patrick Hallenbeck, président-rapporteur

Dr. Serge Guiot, directeur de recherche

Dr. Richard Villemur, membre du jury

## Résumé

Le tétrachloroéthène (PCE) et les éthènes chlorés qui lui sont apparentés ont été abondamment utilisés pour plusieurs applications en industrie dès le début du 20<sup>e</sup> siècle. Ils sont cependant comptés parmi les polluants les plus communs des sols et de l'eau et beaucoup d'efforts sont déployés afin de les éliminer. Nous croyons que la conversion des éthènes chlorés en éthènes par des microorganismes est une solution prometteuse. Le premier aspect du projet visait donc à établir les conditions pour lesquelles un consortium enrichi en *Dehalococcoides ethenogenes* permettrait la conversion complète de PCE en éthène. Les expériences réalisées nous ont permis de souligner le rôle de l'acide lactique ajouté aux cultures comme source de carbone et source indirecte d'électrons pour la déhalorespiration. Nous avons également pu établir l'effet de la concentration initiale de biomasse dans les cultures sur le profil de déhalogénéation du PCE. Le deuxième aspect du projet visait à développer un protocole d'encapsulation du consortium dans une matrice polymérique afin de profiter des nombreux avantages potentiels de l'encapsulation. Nous avons testé trois montages d'encapsulation différents : atomisation avec jet d'air, atomisation avec vibrations ultrasoniques et « drop-wise ». Le dernier montage prévoyait l'encapsulation des cultures dans des billes d'alginate enrobées de chitosane gélifié par du lignosulfonate. C'est le seul montage qui nous a permis d'encapsuler le consortium de façon efficace sans effet significatifs négatifs sur son activité de déchlorination. Aussi, la comparaison des profils de déhalogénéation du PCE de cellules encapsulées et cellules libres a montré une plus faible accumulation de TCE, 1,2-DCE et VC dans les échantillons de cellules encapsulée et, par conséquent, une conversion plus rapide et plus complète du PCE en éthène. Finalement, nous avons observé une tendance favorable à l'idée que les microorganismes encapsulés bénéficient d'un effet de protection contre de faibles concentrations d'oxygène.

**Mots-clés :** encapsulation, alginate, biorémédiation, PCE

## Astract

Tetrachloroethylene (PCE) and other chlorinated ethenes have been used for industrial purposes since the beginnning of 20th century. However, they are now considered common pollutants of soil and water. A lot of efforts are directed toward elimination of these compounds and we believe degradation of these chlorinated ethenes by microorganisms is the best solution. The first step of this project was to establish a complete conversion of PCE to its non-toxic product ethylene using an enriched consortium of *Dehalococcoides ethenogenes*. Our results show the importance of lactic acid as a carbon source and indirect source of electrons in a reaction known as dehalorespiration. We have been able to establish the effect of initial biomass on the biodegradation profile of PCE. The second step of the project was to obtain a working protocol for encapsulation of the consortium in a polymeric matrix. Such immobilization procedure would then allows numerous possible advantages as shown in the literature. We tested three encapsulation setups: air atomization, ultrasonic atomization and drop-wise technique. In the last setup, we successfully encapsulated the bacterial consortium into particles made of an alginate core surrounded by a chitosan layer. Thus the drop-wise technique allowed encapsulation of the consortium without negative effects on its dechlorination activity. In addition, the dechlorination profiles of encapsulated cells showed a lower accumulation of chlorinated intermediates TCE, 1,2-DCE and VC which yield a more rapid and complete conversion of PCE to ethylene. Finally, our results support the idea that encapsulated microorganisms may benefit from a protective effect when oxygen is present in the medium.

**Keywords :** encapsulation, alginate, bioremediation, PCE

# Table des matières

Résumé.....	iii
Astract .....	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	vii
Liste des abréviations.....	xii
Introduction.....	1
1. Revue de la littérature .....	4
1.1. Caractéristiques du PCE et des ses produits de dégradation.....	4
1.2. Biodégradation des éthènes chlorés .....	11
1.3. <i>Dehalococcoide ethenogenes</i> .....	15
1.4. Avantages et exemples de l'encapsulation de cellules.....	19
1.5. Polymères.....	25
1.6. Méthodes d'encapsulation.....	28
2. Hypothèses et objectifs .....	32
3. Matériel et Méthodes.....	35
3.1. Polymères.....	35
3.2. Cultures cellulaires.....	36
3.3. Premier montage : microencapsulation par atomisation avec jet d'air .....	38
3.4. Second montage : microencapsulation par atomisation ultrasonique .....	40

3.5. Troisième montage : encapsulation avec la technique du « drop-wise » .....	43
3.6. Enrobage à la chitosane.....	45
3.7. Contamination volontaire par l'oxygène.....	45
3.8. Méthodes d'analyse.....	45
 4. Résultats .....	 49
4.1. Culture KB1 .....	49
4.1.1. Premières cultures .....	49
4.1.2. Contamination par l'oxygène.....	50
4.1.3. Stimulation par l'acide lactique .....	51
4.1.4. Effet de l'accroissement de la quantité de microorganismes .....	56
4.1.5. Résumé des résultats et conclusion sur la culture KB1.....	61
 4.2. Développement et optimisation de l'encapsulation .....	 64
4.2.1. Choix des polymères .....	64
4.2.2. Absorption par l'alginate et la chitosane.....	68
4.2.3. Premier montage : microencapsulation par atomisation avec jet d'air .....	70
4.2.4. Deuxième montage : microencapsulation par atomisation avec ultrasons.....	74
4.2.5. Troisième montage : encapsulation par « drop-wise ».....	84
4.3. Effets de l'encapsulation lors de la contamination par l'oxygène .....	88
 5. Discussion sur l'impact de l'encapsulation sur l'activité du consortium enrichi en <i>Dehalococcoides ethenogenes</i> .....	 93
 Conclusions et perspectives .....	 100
 Bibliographie.....	 103

## Liste des tableaux

Tableau 1. Échantillons d'alginate et agents gélifiants utilisés lors des tests visant à identifier les conditions nécessaires à la formation de billes gélifiées.....	65
Tableau 2. Échantillons de chitosane et agents gélifiants utilisés lors des tests visant à identifier les conditions nécessaires à la formation de billes gélifiées .....	66
Tableau 3. Échantillons d'alginate, agents gélifiants et agents d'enrobage utilisés lors des tests visant à identifier les conditions nécessaires à la formation de billes gélifiées .....	67
Tableau 4. Efficacité d'encapsulation déterminée par le poids sec des échantillons finaux et de la solution d'alginate de départ pour trois conditions d'encapsulation utilisées avec le premier montage.....	72
Tableau 5. Estimation de la survie des cellules de <i>E. coli</i> au processus d'encapsulation par vibrations ultrasoniques. ....	75
Tableau 6. Échantillons d'alginate et agents gélifiants utilisés lors des tests visant à identifier les conditions nécessaires à la formation de billes gélifiées avec le deuxième montage .	76
Tableau 7. Échantillons de chitosane et agents gélifiants utilisés lors des tests visant à identifier les conditions nécessaires à la formation de billes gélifiées avec le deuxième montage .....	77
Tableau 8. Échantillons d'alginate, agent gélifiant et agent d'enrobage utilisés lors des tests visant à identifier les conditions nécessaires à la formation de billes gélifiées à l'aide du deuxième montage .....	79

## Liste des figures

Fig. 1. Structure des trois isomères d'éthènes chlorés portant deux atomes de chlore .....	8
Fig. 2. Déhalogénéation oxydative du TCE par l'enzyme méthane monooxygénase .....	12
Fig. 3. Déhalogénéation oxydative du 2-halobenzoate par 2-halobenzoate 1,2-dioxygénase .....	12
Fig. 4. Exemple de profil de déhalogénéation du PCE par <i>Dehalococcoides ethenogenes</i> 195 réalisé par l'équipe de Maymó-Gatell, Anguish et Zinder (51).....	17
Fig. 5. Profil de déhalogénéation du PCE dans un système reconstitué in-vitro par l'équipe de Magnuson et al. (42).. .....	18
Fig. 6. Structure d'un brin de polymère de chitine et de chitosane.....	27
Fig. 7. Modèle proposé pour la gélification (cross-link) de la chitosane avec du lignosulfonate.	28
Fig. 8. Schéma du montage d'encapsulation avec jet d'air.....	39
Fig. 9. Schéma du montage d'encapsulation avec vibrations ultrasoniques .....	41
Fig. 10. Photographies montrant l'atomiseur et le générateur.. .....	42
Fig. 11. Schéma du montage d'encapsulation par « drop-wise » .....	44
Fig. 12. Profil de déhalogénéation du PCE par l'une des premières cultures de KB1 et profil de déhalogénéation du PCE dans les bouteilles contrôle avec milieu de culture stérile. ....	49



Fig. 13. Profil de déhalogénéation du PCE par l'une des premières cultures de KB1 contaminée par de l'oxygène lors de l'inoculation.....	51
Fig. 14. Profil de déhalogénéation du PCE par la culture KB1 ayant reçue une dose d'acide lactique correspondant à 5 mM au jour 18 après l'inoculation.....	52
Fig. 15. Profil de déhalogénéation du PCE par la culture KB1 ayant reçue une solution saline au jour 18 après l'inoculation.. ..	53
Fig. 16. Comparaison du pourcentage des concentrations finales de 1,2-DCE, VC et éthène par rapport à la concentration totale du PCE et de ses produits de déhalogénéation dans les échantillons pour des cultures stimulées et non-stimulées par l'ajout d'acide lactique (5 mM).....	54
Fig. 17. Profil de déhalogénéation du PCE par la culture KB1 ayant reçue des doses additionnelles de 5 mM d'acide lactique et de 50 $\mu$ M de PCE au jour 15 après l'inoculation.. ..	55
Fig. 18. Augmentation de la quantité de protéines dans des cultures ayant reçues des doses supplémentaires de 5mM d'acide lactique.....	56
Fig. 19. Profil de déhalogénéation du PCE par la culture KB1. La concentration de protéines au départ est de 11,3 mg/L.....	57
Fig. 20. Profil de déhalogénéation du PCE par la culture KB1. La concentration de protéines au départ est de 55,0 mg/L.....	58
Fig. 21. Profil de déhalogénéation du PCE par la culture KB1. La concentration de protéines au départ est de 63,6 mg/L.....	58
Fig. 22. Profil de déhalogénéation du PCE par la culture KB1. La concentration de protéines au départ est de 85,0 mg/L.....	59

Fig. 23. Variation du pourcentage de PCE, 1,2-DCE, VC et éthène présents à 2,8 jours en fonction de la concentration initiale de protéines dans les échantillons de la culture KB1. ....	60
Fig. 24. Concentration de PCE en micromoles par litre dans les échantillons contenant 1,0 g de billes d'alginate. ....	69
Fig. 25. Concentration de PCE en micromoles par litre dans les échantillons contenant 1,0 g de billes de chitosane. ....	69
Fig. 26. Microcapsules d'alginate obtenues avec le premier montage. ....	71
Fig. 27. Profil de déhalogénéation du PCE par la culture KB1 immobilisée dans des capsules préparées selon le protocole du deuxième montage. ....	80
Fig. 28. Profil de déhalogénéation du PCE par la culture KB1 en suspension libre (deuxième montage). ....	80
Fig. 29. Profil de déhalogénéation du PCE par la culture KB1 immobilisée dans des capsules préparées selon le protocole du deuxième montage et contaminées par une quantité inconnue d'oxygène. ....	81
Fig. 30. Profil de déhalogénéation du PCE par la culture KB1 immobilisée dans des capsules préparées selon le protocole du troisième montage (drop-wise). La concentration de protéines au départ est de 55,0 mg/L. ....	85
Fig. 31. Profil de déhalogénéation du PCE par la culture KB1 en suspension libre (troisième montage). La concentration de protéines au départ est de 55,0 mg/L. ....	86

- Fig. 32. Profil de déhalogénéation du PCE par la culture KB1 immobilisée dans des capsules préparées selon le protocole du troisième montage (drop-wise). La concentration de protéines au départ est de 85,0 mg/L. .... 86
- Fig. 33. Profil de déhalogénéation du PCE par la culture KB1 en suspension libre. La concentration de protéines au départ est de 85,0 mg/L. .... 87
- Fig. 34. Profil de déhalogénéation du PCE par des cultures KB (contamination volontaire par l'oxygène). .... 90
- Fig. 35. Pourcentage des molécules de PCE qui ont perdu aucun, au moins deux, au moins trois ou les quatre atomes de chlore au temps 5,6 jours dans les échantillons de cellules encapsulées avec le protocole du troisième montage (drop-wise). .... 91
- Fig. 36. Pourcentage des molécules de PCE qui ont perdu aucun, au moins deux, au moins trois ou les quatre atomes de chlore au temps 5,6 jours dans les échantillons de cellules libres. .... 91

## Liste des abréviations

ATP	:	adénosine triphosphate
cps	:	centipoise
DCE	:	dichloroéthène
EDTA	:	acide éthène-diamine-tétraacétique
ETH	:	éthène
G	:	$\alpha$ -L-acide guluronique
kDa	:	kilodalton
M	:	$\beta$ -D-acide mannuronique
m/v	:	masse / volume
PCE	:	tétrachloroéthène
ppb	:	parties par milliard
ppm	:	parties par million
psi	:	livres par pouce carré
rpm	:	rotations par minute
SDS	:	dodécylsulfate de sodium
TCE	:	trichloroéthène
VC	:	chlorure de vinyle
v/v	:	volume/ volume

# Introduction

Parmi les polluants les plus communs et les plus difficiles à éliminer se retrouvent le tetrachloroéthène (PCE) et trichloroéthène (TCE), deux composés utilisés en grande quantité comme solvants industriels dès le début du 20<sup>e</sup> siècle (1, 44, 85). Plusieurs auteurs attribuent la présence du PCE et TCE dans l'environnement à leur grande utilisation et aux faibles normes d'entreposage (3, 25, 27, 50, 51, 73, 75). Ces polluants se retrouvent principalement dans le sol et l'eau et sont considérés comme toxiques pour les humains (2). Beaucoup d'efforts sont donc déployés afin de développer un moyen efficace et peu coûteux pour les éliminer.

L'élimination du PCE et TCE peut se faire avec plusieurs procédés chimiques et physiques mais le haut degré d'oxydation de ces composés ainsi que leur faible solubilité dans l'eau rendent difficiles les méthodes d'oxydation (43). Les procédés physiques de pompage ou d'absorption ont une certaine efficacité mais ne font que transférer le polluant d'un environnement à un autre. C'est pour ces raisons que la transformation du PCE en composés inoffensifs avec des procédés biologiques a connue un grand intérêt (27). Le PCE et autres éthènes chlorés peuvent en effet être éliminés par plusieurs bactéries et même être utilisés comme accepteur d'électrons dans une réaction connue sous le nom de déchlororespiration (67). La déchlororespiration du PCE a d'ailleurs déjà été réalisée en laboratoire avec des consortiums bactériens en condition anaérobie (41). Dans ces expériences, le PCE était utilisé comme source d'énergie par les bactéries en enlevant successivement les atomes de chlore de la molécule. Le PCE était alors transformé en TCE, puis en dichloroéthène (DCE), chlorure de vinyle (VC) et finalement éthène (29). On peut retrouver dans la littérature de nombreux exemples de transformation des éthènes chlorés par les bactéries mais souvent, plusieurs souches bactériennes différentes doivent être utilisées afin de convertir complètement le PCE jusqu'à l'éthène (29, 67). Par exemple, si un consortium anaérobie de méthanogène est nourris avec du PCE et autres nutriments, la transformation s'arrêtera souvent au stade du DCE ou du VC et la transformation des éthènes chlorés au-delà de ce stade sera possible par la présence d'un consortium additionnel formé de bactéries méthanotrophes (21). Il est donc possible, en théorie, d'envisager l'élimination de ces polluants à l'aide de microorganismes en enrichissant les sols contaminés avec des bactéries (bioaugmentation). Cependant, dans la pratique, la transformation du PCE et

du TCE dans l'environnement libère le plus souvent du dichloroéthène (DCE), et du chlorure de vinyle (VC), deux produits toxiques pour la santé des êtres vivants, voire même cancérigènes dans le cas du chlorure de vinyle. La conversion finale vers l'éthène est donc la plupart du temps très limitée. Pourtant, afin d'être vraiment avantageuse, la transformation du PCE doit se faire complètement jusqu'à l'éthène, un produit considéré comme non-toxique (8, 27).

Une solution à ce problème fut rendue possible grâce à l'isolement, par l'équipe de Maymo-Gatell, Chien, Gossett et Zinder (51), d'une bactérie capable de convertir complètement le PCE en éthène: *Dehalococcoides ethenogenes* 195. Cette bactérie anaérobie est aussi capable d'utiliser une gamme variée de composés chlorés comme accepteur d'électrons pour sa croissance. En raison de la capacité unique qu'a *D. ethenogenes* 195 de transformer le PCE, il est raisonnable de penser qu'elle pourrait s'avérer utile pour une stratégie de bioaugmentation dans un site contaminé. Malheureusement, elle ne peut être cultivée seule sans nécessiter un ou plusieurs composés encore inconnus pour survivre (50, 51). Ce(s) composé(s) ne semble pas se retrouver chez toutes les bactéries et pour l'instant la seule façon de cultiver *D. ethenogenes* en culture pure est d'ajouter un culot de bactéries anaérobies soniquées provenant de cultures capables de déhalogéner le PCE (42, 50, 51). Un premier aspect de ce projet vise donc à établir un système stable d'élimination complète du PCE à l'aide de cellules de *D. ethenogenes*.

L'autre aspect du projet vise à encapsuler les bactéries responsables de cette conversion. L'encapsulation est une technique visant à immobiliser des cellules, protéines ou autres molécules dans une matrice polymérique ayant le plus souvent la forme d'une sphère. La structure des capsules et le choix du polymère varient selon les besoins : bioréacteurs microscopiques pour la production industrielle, entreposage, culture cellulaire, distribution de médicaments ou probiotiques (40, 57, 65). Le plus souvent, la taille des pores de la matrice polymérique permet l'échange de nutriments et déchets cellulaires avec le milieu extérieur et les cellules peuvent ainsi survivre et se reproduire à l'intérieur des capsules. Les avantages de l'encapsulation qui sont le plus souvent rapportés sont une plus grande efficacité de production dans le cas des bioréacteurs ainsi que la protection du matériel encapsulé contre les conditions de l'environnement extérieur comme des écarts de pH et température, substances toxiques, anticorps d'un hôte etc. (40, 57, 74) Il est également possible d'encapsuler des cellules et inclure

dans la matrice polymérique des nutriments, enzymes et autres co-substrats (74). Nous pensons donc pouvoir profiter des nombreux avantages de l'encapsulation afin d'améliorer l'efficacité de conversion du PCE par *D. ethenogenes* tant dans un environnement difficile qu'en conditions optimales. L'obtention d'un système de transformation complète du PCE à l'aide de bactéries encapsulées représentera donc une étape majeure de ce projet.

Finalement, l'objectif de ce projet est de proposer un modèle stable de cellules bactériennes encapsulées pouvant servir à la conversion complète du PCE en éthène. Nous voulons aussi comparer le profil de transformation du PCE par des cellules encapsulées et des cellules en suspension afin de démontrer un ou plusieurs avantages de l'encapsulation. Le départ de ce travail se fera par une revue de la littérature disponible dans le but de comprendre les différents aspects relatifs à la réalisation de notre objectif. Nous répondrons à diverses questions telles que :

- qu'est-ce que le PCE et les produits de sa déhalogénéation?
- quelles sont les différents mécanismes biochimiques retrouvés chez les bactéries pour transformer les éthènes chlorés.
- quelles sont les caractéristiques de la bactérie *Dehalococcoides ethenogenes* et en quoi est-elle utile pour la conversion complète du PCE?
- qu'est-ce l'encapsulation : exemples concrets, matériaux et techniques?

Nous poursuivrons ensuite par la présentation des méthodes et matériel utilisés pour développer un modèle d'encapsulation de *D. ethenogenes*. Puis, nous présenterons les résultats des différentes étapes menant à la réalisation de notre objectif et nous terminerons par une analyse des travaux en mettant l'accent sur l'impact de ceux-ci sur des recherches futures.

# 1. Revue de la littérature

## 1.1. Caractéristiques du PCE et des ses produits de dégradation

Le PCE, TCE, DCE et VC composent la famille des chloroéthènes, une famille de composés à deux carbones liés par un double lien covalent et portant de un à quatre atomes de chlore. Ces molécules font parties d'un plus grand groupe de composés chlorés dérivées du méthane, éthane, éthylène appelés organo-chlorés aliphatiques (62). Nous aborderons les chloroéthènes comme des composés toxiques produits en grande quantité par les industries. Cependant, il est important de souligner qu'environ 2200 organo-chlorés incluant les chloroéthènes sont aussi produit naturellement dans l'environnement par des organismes vivants (bactéries, plantes, insectes, mammifères, champignons) ou par des processus thermiques dans les océans, atmosphère et souterrains (30). Par exemple, une quantité importante d'organo-chlorés est produite par les feux de forêt. En raison du manque de données sur les sources naturelles de ces composés, il nous est impossible de comparer la quantité d'organo-chlorés produits naturellement à ceux produits par l'industrie. Cependant, nous ne pouvons nier que plusieurs sites à travers le monde contiennent des concentrations élevées d'organo-chlorés en raison de l'activité humaine.

Nous présentons ici le PCE ainsi que ses produits de dégradation jusqu'à l'éthène. Pour chacun, nous rapportons les principales méthodes de fabrication, caractéristiques physico-chimiques, sources de pollution par l'activité humaine ainsi qu'une courte analyse des données sur leur toxicité.

### **PCE**

Le tétrachloroéthène (PCE) est un solvant industriel synthétique dont la production remonte à 1821 lorsque le scientifique Michael Faraday procéda à la décomposition thermique de l'hexachloroéthane (33). D'autres méthodes de fabrication ont ensuite été développées comme l'oxychloration du 1,2-dichloroéthane et la chloration de résidus chlorés comme l'oxyde de propylène. Le PCE a connu un essor rapide au 20e siècle surtout en raison du fait qu'il représentait peu de risque d'inflammation comparé à d'autres solvants industriels (25, 75).



Depuis, ce solvant est un produit commun retrouvé au niveau domestique, industriel et militaire pour des applications comme le nettoyage à sec de tissus, le dégraissage de pièces mécanique et la finition de la coloration des tissus (8, 49, 75). Au début du 20<sup>e</sup> siècle, il était aussi utilisé pour le traitement des infestations par certains nématodes (8). Enfin, le PCE est aussi utilisé comme intermédiaire dans la production d'acide trichloroacétique et certains réfrigérants fluorés (25).

Dans des conditions normales, le PCE se retrouve sous la forme d'un liquide incolore avec une légère odeur sucrée (3). Il est très peu soluble dans l'eau (15 mg/100ml à 20°C) mais miscible dans l'éthanol et autres solvants organiques hydrophiles (8). Le PCE en solution pure sans stabilisants se dégrade lentement en présence d'air, d'humidité et de lumière (13). Même en présence de stabilisants, il reste sensible à la lumière. Ses synonymes sont : tétrachlorure d'éthène, perc, perchlore, perchloroéthène, tétrachloroéthène et perk (8).

Le PCE peut se retrouver dans l'environnement dès l'utilisation en s'évaporant dans l'air. Les vêtements nettoyés avec du PCE libèrent aussi dans l'air une partie du PCE emprisonné dans les fibres. Plusieurs auteurs partagent l'opinion que l'utilisation à grande échelle ainsi que des mesures déficientes d'entreposage et d'utilisation ont contribué à faire du PCE et autres éthènes chlorés des contaminants communs de l'eau et des sols (3, 25, 27, 49, 50, 73, 75). Le PCE se retrouve généralement à une concentration de moins de 1 ppb dans l'air d'une ville et cette concentration s'élève rarement au-dessus de 1 ppm dans l'air entourant les commerces de nettoyage à sec et les sites d'entreposage de PCE (3). Par contre, l'eau contaminée avec du PCE peut contenir plus de 1 ppm (1 mg/L ou 6µM PCE) et la «Environmental Protection Agency» aux États-Unis fixe la limite de PCE pouvant se retrouver dans l'eau potable à 5 ppb (3). Chez les animaux, le PCE absorbé se retrouve dans les tissus graisseux et les membranes cellulaires (13).

Le PCE est toxique pour les humains et animaux de laboratoires principalement en cas d'inhalation ou ingestion. En grande quantité dans l'air (>1000 ppm), il affecte en quelques minutes le système nerveux central et peut causer étourdissements, somnolence, vomissement, perte de conscience, troubles respiratoires et arythmie cardiaque (13). À des concentrations plus faibles (100 ppm à 100 0ppm) des nausées et irritations des yeux et des voies aériennes

supérieures sont rapportés (13). En cas d'ingestion, le PCE cause des troubles digestifs et une dépression du système nerveux central (13). Le PCE a aussi des effets sur le foie et les reins causant des dommages parfois irréversibles. Une exposition chronique au PCE à long terme peut causer des troubles psychiques comme des troubles de mémoire et altération de l'humeur. Certaines études chez des femmes travaillant dans des industries de nettoyage à sec rapportent aussi une augmentation des problèmes de menstruation et d'avortements spontanés (3). Concernant les effets mutagènes ou cancérigènes du PCE, les nombreuses études n'arrivent pas à un consensus. Une équipe de recherche américaine a d'ailleurs regroupé plus de 44 articles sur le sujet et déterminé si le PCE avait des effets cancérigènes sur les animaux incluant les humains. Ils sont arrivés à la conclusion qu'il n'existe pas de lien ou qu'il manque de preuves pour relier l'exposition au PCE au cancer (59). Enfin, le PCE est considéré comme un cancérigène suspecté.

## **TCE**

Le trichloroéthène est, tout comme le PCE, un solvant industriel utilisé comme agent de dégraissage pour nettoyer les métaux (12). Il est fabriqué en utilisant du dichloroéthène et des ions de chlore. Le procédé d'oxychlorination donne du PCE et du TCE qui sont ensuite séparés (4). Le TCE est aussi utilisé comme solvant pour les graisses, huiles, cires et autres substances grasses dans l'industrie du textile. Il s'agit également d'un intermédiaire dans la synthèse de produits pharmaceutiques comme les aliphatiques polychlorés ou la production d'insecticides. Au niveau domestique, le TCE entre dans la composition de substances adhésives, lubrifiants, peinture, vernis et pesticides (31). Il peut aussi être utilisé comme réfrigérant et comme solvant dans l'industrie aéronautique pour chasser l'oxygène liquide (31).

Dans des conditions normales le TCE se retrouve sous la forme d'un liquide incolore avec une légère odeur sucrée, rappellent l'odeur du chloroforme (12). Il est, tout comme le PCE, très peu soluble dans l'eau (0,1 g/100 ml à 20°C) et miscible dans la plupart des solvants organiques comme l'éthanol, l'étherdiéthylique, acétone, etc. (12). Le TCE pur réagit violemment avec les bases fortes, libérant du dichloroacétylène (explosif), ainsi que les poudres métalliques. Il se dégrade lentement lorsqu'il est exposé à l'air et à l'humidité (12). Il est donc nécessaire de le stabiliser (2% époxydes ou amines) (4). Ses synonymes sont trichloroéthène,

1,1,2-trichloroéthène, 1,1,2-trichloroéthène, Triclene, Vitran, Threthylene, Triasol, trichlorure d'éthène (4, 12).

La principale source du TCE qui se retrouve dans l'environnement est sans contredits le rejet des usines qui utilisent le TCE comme solvant (4). Des problèmes d'entreposage peuvent aussi libérer les stocks directement dans l'eau et les sols. Cependant, puisque le TCE est sensible à la lumière et à l'air, sa demi-vie dans l'atmosphère est d'environ une semaine. Sa dégradation entraîne alors la formation d'un irritant pulmonaire : le phosgène (4). Dans l'eau de surface, sa demi-vie est d'environ deux semaines. Les milieux pollués par le TCE sont donc le plus souvent les sols et les nappes d'eau souterraines. Les listes prioritaires de l'EPA aux États-Unis ont identifiés le TCE sur au moins 861 des 1 428 sites dangereux sur l'ensemble du territoire (4). En somme, le TCE est surtout retrouvé dans les sols et dans l'air à proximité des usines qui en font l'usage. Des travailleurs dans ces usines peuvent être exposés à des niveaux de TCE qui varient entre 1 et 100 ppm.

Le PCE et TCE sont similaires quand aux effets toxiques observé chez les animaux de laboratoires et chez les humains. Le principal effet toxique aigu du TCE est une dépression du système nerveux central causant des étourdissements, somnolence, vomissement, troubles respiratoires, perte de conscience, faible coordination et arythmie cardiaque (12, 13). Le TCE a également des effets sur le foie et les reins. Des effets toxiques ont été observés sur les cellules de Clara dans les poumons de souris (12). À des concentrations plus faibles ( $\leq 1000$  ppm), les effets irritants (yeux, peau, poumons) du TCE sont mis en évidence. Chez les souris et les rats, le TCE est souvent reconnu comme cancérigène sans toutefois confirmer hors de tout doute les effets mutagènes (12). Finalement, en raison de biais ou manque de résultats significatifs, le caractère mutagène ou cancérigène du TCE chez les humains n'a pu être confirmé. Il en est de même pour les effets sur la reproduction humaine (12).

## **DCE**

Nous regroupons les produits de la déchlorination du TCE sous l'unique nom de dichloroéthène (DCE). Cependant la déchlorination du TCE libère en fait trois types de molécules différentes portant toutes deux atomes de chlore mais à des positions différentes. Ces

composés sont utilisés principalement comme intermédiaires dans la production de chlorure de vinyle (80) et solvants dans de nombreux produits domestiques (graisses, parfums, laques) (14). Anciennement, les isomères de 1,2-DCE étaient utilisés comme anesthésiques (14).

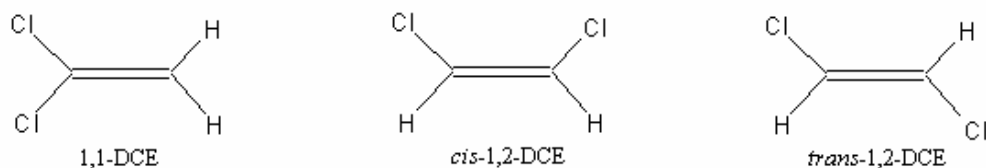


Fig. 1. Structure des trois isomères d'éthènes chlorés portant deux atomes de chlore

Ces trois molécules se retrouvent toutes sous forme liquide à température et pression normales. Elles ont aussi une odeur caractéristique de chloroforme et une plus grande solubilité dans les solvants organiques (80). La solubilité dans l'eau du 1,2-DCE est de 0.35 g / 100 ml pour l'isomère *cis* et 0.64 g / 100 ml pour l'isomère *trans* (14). Tout comme le PCE et TCE, les éthènes chlorés à deux carbones sont susceptibles à la lumière, l'air et l'humidité. En se décomposant, ils deviennent des produits corrosifs comme par exemple de l'acide chlorhydrique (14). Ils réagissent également avec les bases fortes en formant un produit explosif: chloroacétylène (14).

Les industries sont les principales sources de pollution par le DCE. Les procédés de fabrication de copolymères de chlore (emballages plastiques flexibles et transparents) libèrent du DCE dans l'air (80). Il est également possible de penser que des accidents lors du stockage, transport et manipulation de DCE sont responsables d'une partie de la pollution par ces composés. Aux États-Unis, le DCE se retrouve surtout dans l'eau, incluant de faibles concentrations dans l'eau potable.

Une forte exposition au DCE (>1000 ppm) a des effets semblables aux autres éthènes chlorés : dépression du système nerveux central, symptômes d'état d'ébriété, convulsions, perte

de conscience (80). Lors de l'exposition à plus long terme chez des rats, des effets toxiques sur le système nerveux, foie, reins et poumons ont été observés (80). Les isomères de 1,2-DCE se fixent sur l'hème et inhibent plusieurs enzymes comme les enzymes à cytochromes P450 (14). Leur action influence donc la toxicité d'autres polluants et médicaments. Ses effets cancérigènes ne sont pas reconnus chez les humains en raison du manque de lien évident entre l'exposition chronique au DCE et le nombre de cancer dans les populations étudiées. Cependant, il a été rapporté à une occasion la présence de tumeurs dans les glandes mammaires et les reins de rats exposés à de faibles concentrations de DCE dans l'eau (5).

## VC

Le chlorure de vinyle (VC) est un éthène chloré qui se distingue des autres produits de dégradation puisqu'il n'est pas utilisé comme solvant industriel. En effet, le VC est plutôt un composant de départ pour la formation du polyvinyle (7), un polymère utilisé dans la fabrication d'une grande variété de plastiques entrant dans la composition de tuyaux, câbles, membranes d'emballages (7). Le VC entre aussi dans la fabrication de meubles, pièces automobiles et divers articles domestiques (7). Aux États-Unis, il a aussi été utilisé dans des aérosols, médicaments et cosmétiques jusqu'en 1974. Le VC est un gaz inodore et incolore avec une légère odeur sucrée. Il est également très inflammable et est soluble dans l'eau (7).

Les sources potentielles du VC sont les émissions des usines qui l'utilisent dans leur procédé de fabrication ou les entrepôts qui contiennent de grands volumes de VC (6, 7). Les nouvelles voitures dégagent aussi une faible dose de VC qui s'évapore des pièces de plastique (6, 7). L'eau peut aussi être contaminée par ce composé si elle est en contact avec des tuyaux de polyvinyle (6, 7). Bien entendu, les dépotoirs où se retrouvent tous les produits fabriqués à base de polyvinyle déchargent du VC dans l'eau de ruissellement et dans l'air. Finalement, il est aussi possible de retrouver du VC dans les zones contaminées avec du PCE, TCE ou DCE comme produit de la biodégradation par la flore microbienne (6).

Une exposition aigüe au VC (10 000 ppm à 20 000 ppm) cause des problèmes au niveau du système nerveux central comme des nausées et des étourdissements (6). À des niveaux plus élevés encore, le VC cause des irritations des voies respiratoires des yeux et des reins (87). Une

inhibition de la coagulation sanguine et des cas d'arythmies cardiaque ont aussi été observés chez des animaux de laboratoires (6). Parmi les effets chroniques non-cancérogènes associés à des doses plus faibles de VC se retrouvent des cas de dommages au foie et aux reins, des symptômes de dommages au système nerveux central ainsi qu'au système nerveux périphérique (6). Une exposition chronique au VC pendant un an a causée des dommages aux testicules et une baisse de fertilité chez des rats (6). Pour finir, le VC est associé à des cas de cancer du foie (angiosarcoma) et a été classé comme carcinogène du groupe A par la « Environmental Protection Agency » américaine (79).

## **Éthène**

L'éthène ou éthylène est le produit final souhaité de la transformation des éthènes chlorés. Contrairement à ces derniers, l'éthène ne contient pas d'atome de chlore et se retrouve sous forme de gaz à pression et température normales (10). Il a une légère odeur sucrée et il est considéré comme inoffensif pour l'être humain (surtout lorsque comparé aux éthènes chlorés mentionnés précédemment). Les risques associés à son utilisation sont surtout liés à ses propriétés inflammables.

Contrairement aux molécules présentées précédemment qui sont surtout produites par les industries, l'éthène est une molécule très présente dans la nature puisqu'elle est aussi produite par des systèmes vivants, principalement les végétaux. En effet, l'éthène est une hormone végétale responsable de plusieurs phénomènes biologiques comme le mûrissement des fruits, l'induction de la production de fleurs ou encore la "mort" des feuilles et des fleurs (48). Ses effets varient selon sa concentration et les espèces exposées. Dans l'industrie alimentaire, l'éthène est un problème important et sa concentration dans les zones d'entrepôts est réduite au minimum pour éviter que les fruits ne mûrissent trop vite. Dans d'autres cas, les fruits pourront être exposés à des concentrations faibles mais constantes de 1 à 50 ppm pour initier leur maturation lorsque viendra le temps de les livrer aux consommateurs (48). La production d'éthène se fait aussi en industrie par pyrolyse à partir d'éthane, propane et butane (70). En raison de la simplicité de la molécule d'éthène ainsi que de son double lien covalent, il est aussi utilisé comme réactif dans des réactions chimiques pour la production de composés chimiques comme les plastiques et les résines (70).

## **1.2. Biodégradation des éthènes chlorés**

Le traitement des sols et eaux contaminés par des éthènes chlorés peut se faire à l'aide de plusieurs méthodes différentes. Notre but ici n'est pas d'en faire une liste exhaustive mais bien d'étudier une approche en particulier à savoir la conversion des éthènes chlorés par l'ajout et/ou le support des populations microbiennes métaboliquement actives dans le site à décontaminer. Cette dernière est une approche alternative aux méthodes traditionnelles qui visaient à pomper (ou creuser) et à traiter l'eau (ou les sols) qui étaient bien souvent lentes et coûteuses (32). En fait, depuis la découverte de bactéries capables d'utiliser les éthènes chlorés comme accepteurs d'électrons, la biorémediation est devenue une approche attrayante et potentiellement efficace.

Comme le PCE et les éthènes chlorés d'intérêt se retrouvent aussi naturellement dans la nature (30), on peut penser qu'il existe des organismes capables de dégrader ces polluants. En fait, les bactéries ont développé à travers le temps divers mécanismes d'élimination de ces composés et il est aujourd'hui possible d'enlever les atomes de chlore du PCE avec des cultures mixtes provenant de milieux aussi communs qu'une station de traitement des eaux usées (27). Il y a cependant une distinction à apporter entre la simple faculté de déchlorination et celle plus complexe qu'est la déchlororespiration. Plusieurs bactéries ont des systèmes leur permettant d'enlever des atomes de chlore des éthènes chlorés et on dira alors quelles sont capables de déhalogénéation ou déchlorination. D'autres bactéries ont des systèmes enzymatiques leur permettant de coupler l'élimination de l'atome de chlore à la production d'ATP. Au niveau de l'énergie, ce phénomène de déchlororespiration est possible puisque le potentiel rédox du couple  $R-Cl / R-H$  est évalué entre +250 mV et +600 mV (34). Nous présentons ici les mécanismes par lesquels les bactéries peuvent transformer les composés halogénés comme le PCE.

### **Déhalogénéation oxydative**

La déhalogénéation oxydative est catalysée par des enzymes utilisant l'oxygène comme les monooxygénases et dioxygénases (24). Ces enzymes, comme par exemple la méthane monooxygénase de certaines bactéries méthanotrophes ou les cytochromes P-450, ont des fonctions biologiques importantes mais peuvent également réagir avec divers composés

halogénés incluant le TCE (41). Les microorganismes capable de déhalogéner les éthènes chlorés grâce à ce système ne retirent pas de bénéfices direct de cette conversion (*i.e.* pas d'énergie ou source de nutriments). Cela peut même nuire à leur compétitivité comme dans le cas de cultures capable de déhalogéner le toluène (47). Le mécanisme de déhalogénéation oxydative dépend du type de monooxygénase. Dans le cas de la conversion du TCE par la méthane monooxygénase, l'enzyme catalyse l'époxydation du composé et le produit résultant est transformé spontanément par hydrolyse ou isomérisation (24). Chez d'autres microorganismes comme *Pseudomonas aeruginosa* 142, la déhalogénéation du 2-halobenzoate se fait par l'enzyme 2-halobenzoate 1,2-dioxygénase en utilisant du NADH comme donneur d'électrons. La conversion se fait aussi en présence d'oxygène moléculaire et les produits sont du HCl, CO<sub>2</sub> et du benzène-1,2-diol. Certaines études suggèrent aussi des mécanismes utilisant de la glutathionne (55). Bien que plusieurs bactéries arrivent à transformer le PCE et TCE, la déhalogénéation s'arrête souvent aux intermédiaires DCE et VC (53). Concernant la déhalogénéation du TCE en pratique, une solution envisagée est l'utilisation de bactéries méthanogènes capables de transformer le TCE en conditions aérobies, couplées à des bactéries méthanotrophes capable de transformer le PCE en TCE en conditions anaérobie (54).

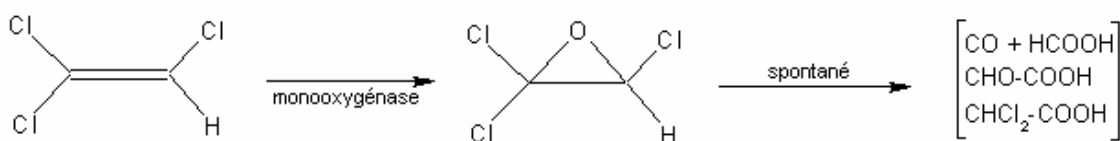


Fig. 2. Déhalogénéation oxydative du TCE par l'enzyme méthane monooxygénase

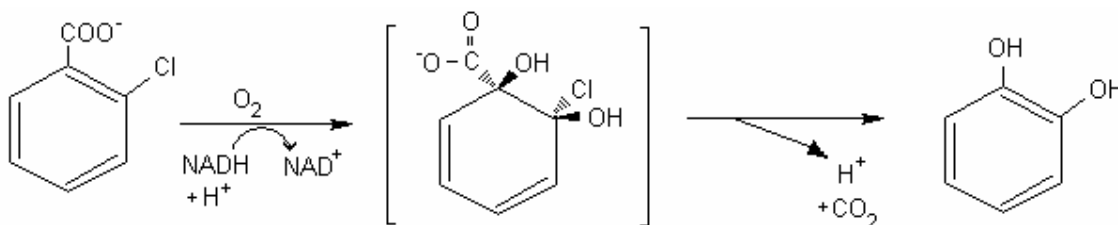


Fig. 3. Déhalogénéation oxydative du 2-halobenzoate par 2-halobenzoate 1,2-dioxygénase



## Déhydrohalogénéation

La déhydrohalogénéation est une réaction qui élimine les halogènes à l'aide d'enzymes déhydrohalogénases. L'atome à enlever, par exemple le chlore, est libéré sous forme de HCl laissant un lien double sur la molécule (25). *Sphingomonas paucimobilis* UT26 est une bactérie qui utilise ce mécanisme pour transformer l'insecticide lindane (60). Pour d'autres bactéries, cette réaction simple est une des nombreuses étapes conduisant à la minéralisation de composés aromatiques portant un ou plusieurs atomes de chlore (25).

## Transfer de méthyle

Chez certaines bactéries anaérobies strictes comme *Acetobacterium dehalogenans*, la déhalogénéation des composés chlorés se fait par transfert de groupe méthyle. Ce microorganisme transforme le chlorométhane grâce à son enzyme chlorométhane déhalogénase qui catalyse le transfert du groupe méthyle de son substrat sur une molécule de tétrahydrofolate. La réaction produit un ion chlore et une molécule de tétrahydrofolate portant un méthyle supplémentaire : méthyltétrahydrofolate (78).

## Déhalogénéation substitutive

La majorité des déhalogénases qui ont été caractérisées sont des enzymes du type déhalogénase hydrolytiques (25). Ces enzymes ont la particularité d'éliminer les halogènes en utilisant de l'eau. L'atome de chlore se trouve ainsi remplacé par un groupe alcool. Un exemple d'enzyme appartenant à cette famille est la 4-chlorobenzoyl-CoA déhalogénase de *Pseudomonas* sp. CBS3 qui enlève l'atome de chlore sur le 4-chlorobenzoyl (25). La déhalogénéation substitutive peut également se faire en utilisant la glutathionne dans une réaction de déhalogénéation thiolitique (25). L'enzyme glutathionne S-transférase peut réagir avec le composé chloré dichlorométhane pour libérer un ion chlore de la molécule. Le complexe formé avec l'enzyme est alors suffisamment instable pour être hydrolysé par de la glutathionne ou du formaldéhyde qui sont tous deux des métabolites importants chez les bactéries méthylophiles.

## Déhalogénéation réductrice

Cette réaction est celle que *D. ethenogenes* utilise pour déhalogéner les éthènes chlorés. Elle est associée aux bactéries anaérobies comme par exemple des méthanogènes et des homoacétogènes (34). La déhalogénéation réductrice se fait au moyen d'enzymes appelés déhalogénases réductrices qui contiennent des facteurs corrinoïdes (exception : un hème chez *Desulfomonile tiedjei*) et sont localisées dans la membrane cellulaire (exception : cytoplasme chez *Dehalospirillum multivorans*) (34). Deux mécanismes de la réaction sont suggérés par Holliger *et al.* : (1) le co-facteur de l'enzyme réagit avec un carbone du PCE pour provoquer l'élimination  $\beta$  d'un atome de chlore; (2) un électron est transféré du co-facteur vers le PCE suivi de la formation d'un anion de chlore et d'un radical de TCE qui réagira avec un proton pour former du TCE (34). Des études sur ces enzymes ont aussi révélées la présence d'autres co-facteurs contenant des noyaux Fe-S. Finalement, il est important de souligner que la TCE-déhalogénase réductrice chez *D. ethenogenes* est l'un des rares enzymes capables de transformer le DCE et le VC.

Bien que ces différentes bactéries et les systèmes présentés fonctionnent pour la déhalogénéation des composés chlorés, la transformation du PCE n'est souhaitable que si elle s'effectue complètement jusqu'à un ou plusieurs composés inoffensifs. Il apparaît que la déhalogénéation complète soit inefficace en condition aérobie (73). D'ailleurs, l'idée qu'une culture en condition aérobie à elle seule ne pouvait déhalogéner tous les éthènes chlorés a été généralement accepté jusqu'en 2001 alors que des chercheurs ont rapportés une conversion partielle de PCE, TCE, DCE et VC par une bactérie *Escherichia coli* recombinante portant un gène codant pour l'enzyme toluène-o-xylène monooxygénase (73). Une déhalogénéation plus efficace est obtenue avec des systèmes complémentaires aérobies/anaérobies. Il semble que le produit final le plus souvent obtenu lors de la déhalogénéation des éthènes chlorés soit l'éthène (27). Certains auteurs ont cependant rapportés une conversion complète vers du CO<sub>2</sub> (82, 83).

### **1.3. *Dehalococcoide ethenogenes***

#### **Découverte**

Plusieurs études sur la dégradation des éthènes chlorés sur des sites contaminés ont révélées que sur certaines d'entre eux, la déhalogénéation se faisait complètement pour donner de l'éthène alors que sur d'autres, la réaction s'arrêtait à des étapes intermédiaires (DCE ou VC) (53). Il fut par la suite démontré que l'inoculation de ces sites avec des consortiums (i.e. bioaugmentation) capables de produire de l'éthène permettait une conversion complète (22, 46). C'est en tentant d'isoler la ou les bactéries responsables de cette conversion complète que l'équipe de Maymo-Gatell, Chien, Gossett et Zinder mirent en évidence le rôle unique de *Dehalococcoides ethenogenes* 195. À l'époque, elle était la seule bactérie connue capable de déhalogéner complètement le PCE jusqu'à l'éthène. Depuis, d'autres bactéries de la même famille ont été isolées et possèdent toutes la capacité d'utiliser des éthènes chlorés comme accepteurs d'électrons. La première *Dehalococcoides* isolée est un coque d'environ 0,5 micromètre. Comme beaucoup d'anaérobies strictes, elle est très susceptible à l'oxygène. Une faible exposition à l'oxygène d'un consortium contenant cette bactérie peut d'ailleurs causer une perte irréversible de l'activité de déhalogénéation. *D. ethenogenes* est capable de déhalorespiration (système couplé à la production d'ATP) et peut utiliser une grande variété de composés de 2 à 5 carbones contenant des atomes de chlore ou brome (52). Lors de l'isolement, il fut remarqué qu'elle résistait aux antibiotiques vancomycine et ampicilline et qu'elle était susceptible à la tétracycline. La susceptibilité à la tétracycline confirmait qu'il s'agissait bien d'une eubactérie et sa résistance aux autres antibiotiques fut expliquée par la structure unique de la paroi cellulaire qui ressemblait aux « S-layers » observées sur les archaea (50).

#### **Enzymes responsables de la déhalogénéation**

Des études faites à partir de cette souche d'origine ont révélés la présence deux enzymes responsables de la conversion du PCE en éthène (42). Lors de l'isolement, ces enzymes se trouvaient dans la fraction cellulaire correspondant à la paroi cellulaire. Ils sont aussi sensibles à l'oxygène. La première protéine est appelé PCE-RDase. Ce type d'enzyme se retrouve chez d'autres bactéries anaérobies comme par exemple *Dehalospirillum multivorans* (61). Chez *D.*

*ethenogenes*, l'enzyme a un poids moléculaire d'environ 51 kDa (44) et il ne déhalogène que le PCE. Le second enzyme, TCE-RDase a un spectre de réactifs plus large : TCE, DCE (tous les isomères) et VC (28). Son activité est cependant plus rapide avec le TCE et le cis-DCE comme substrats. Le trans-DCE et le VC sont déhalogénés environ 2 fois moins vite (42). Son poids moléculaire est de 61 kDa (44). Finalement, les deux enzymes possèdent un groupe corrinoïde leur permettant d'être impliqués dans la réaction de déchlororespiration en utilisant comme accepteur d'électrons les éthènes chlorés et comme donneur d'électrons l'hydrogène moléculaire (34, 52).

### **Profil de déhalogénéation**

La déhalogénéation du PCE par les bactéries *D. ethenogenes* est complexe en raison de la diversité des produits intermédiaires et le système enzymatique utilisé. Lorsqu'on observe les changements de concentration du PCE et de ses produits de transformation sur une période de plusieurs jours, on remarque un profil général qui peut être divisé en phases. Durant la première phase de la déhalogénéation, le PCE est converti rapidement ce qui se traduit par une accumulation presque simultanée des autres intermédiaires chlorés. La deuxième phase de la déhalogénéation est caractérisée par la disparition finale du PCE et la conversion des intermédiaires TCE et 1,1-DCE en 1,2-DCE et VC. De faibles concentrations de PCE semblent être requises pour la conversion des intermédiaires (51). La dernière phase de la déhalogénéation a lieu lorsque le PCE, TCE et DCE ont complètement disparus. La concentration de VC commence alors à baisser et une concentration significative d'éthène apparaît. Nous présentons dans la figure suivante (figure 4) un exemple de profil de déhalogénéation réalisé par l'équipe de Maymó-Gatell, Anguish et Zinder avec des bactéries *D. ethenogenes* en culture pure.

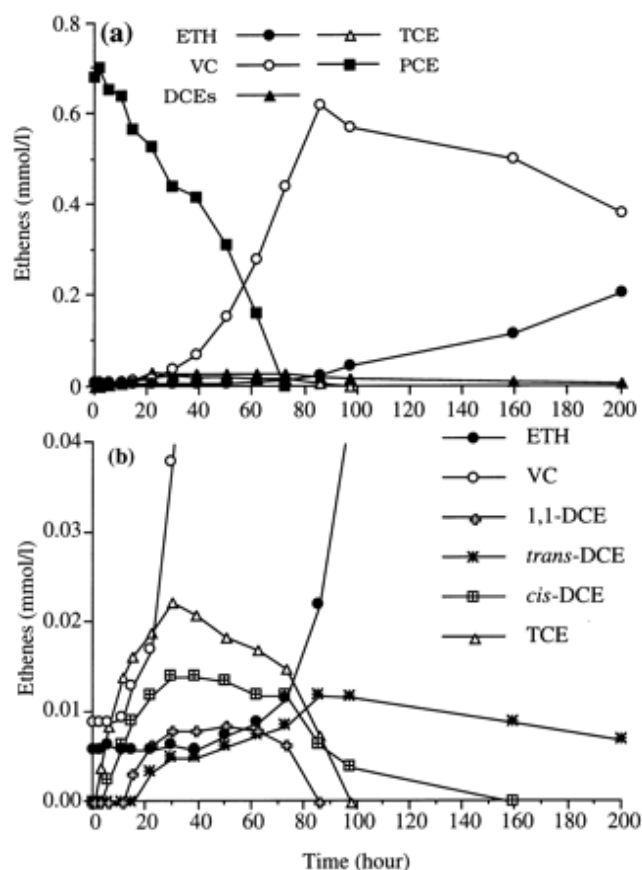


Fig. 4. Exemple de profil de déhalogénéation du PCE par *Dehalococcoides ethenogenes* 195 réalisé par l'équipe de Maymó-Gatell, Anguish et Zinder (51). a) Une dose de 0.7 mmol de PCE a été donnée à des bactéries cultivées dans un milieu contenant du PCE. b) Agrandissement du premier graphique montrant les intermédiaires de la réaction.

Lors de la purification des deux enzymes déhalogénases réductrices de *D. ethenogenes*, des chercheurs ont tenté de reconstituer le système de déhalogénéation du PCE *in-vitro* (42). La PCE-RDase et la TCE-RDase de *D. ethenogenes* 195 ont été mis en présence de PCE et de Titanium (III) citrate comme donneur d'électrons. Le profil résultant est similaire à celui observé pour des bactéries en culture pure (figure 5).

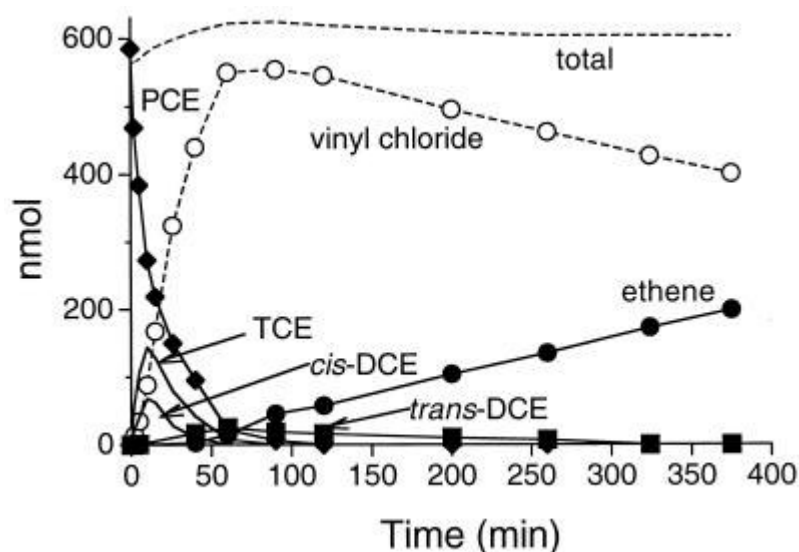


Fig. 5. Profil de déhalogénéation du PCE dans un système reconstitué in-vitro par l'équipe de Magnuson et al. (42). La concentration initiale de PCE est de 600 nmol avec du Titanium (III) citrate comme donneur d'électrons. Les enzymes responsables de la réaction sont la PCE-RDase et la TCE-RDase isolées à partir d'une culture pure de *Dehalococcoides ethenogenes* 195.

### Facteurs manquants pour la croissance

L'isolement de la bactérie *D. ethenogenes* à partir de cultures anaérobies capables de convertir complètement les éthènes chlorés a été facilité par sa résistance à l'ampicilline. Bien que les cellules isolées de cette façon soient actives, elles ne peuvent être transférées dans un milieu frais pour croître de nouveau. L'ajout du surnageant stérile ou du culot soniqué de la culture mixte d'origine permet de nouveau la croissance et cet ajout spécial est nécessaire à chaque transfert d'une culture pure de *D. ethenogenes* (50). Selon l'équipe de Maymo-Gatell, Chien, Gossett et Zinder, une ou plusieurs molécules seraient fournies par les autres bactéries présentes dans le milieu mixte et seraient essentielles à la croissance de la bactérie d'intérêt. Dans l'espoir de trouver ce(s) facteur(s) manquant(s), les enzymes responsables de la déchloration, PCE-RDase et TCE-RDase ont été étudiés (42). Les deux enzymes contiennent un facteur corrinoïde contenant au moins un atome de cobalt (Co(I)). L'activité de déchloration du TCE et du VC de la TCE-RDase présente aussi des similitudes avec la vitamine B<sub>12</sub> et il est établi que l'activité de déchloration de *D. ethenogenes* est stimulée par de fortes concentrations de cette vitamine (0,5 mg/L) (49). Malgré les études faites sur le sujet et à notre connaissance, le

ou les facteurs « mystère » n'ont pas encore été identifiés. Comme solution temporaire à l'utilisation de cette bactérie en souche pure, les cultures sont amendées avec des extraits de microorganismes cultivés sur un mélange butyrate-PCE ou, anciennement, d'extraits de cultures anaérobies cultivées sur H<sub>2</sub>-PCE (50, 51). Mais dans la pratique, la faible croissance de la souche en culture pure et les besoins nutritionnels complexes compromettent sérieusement sa survie lors de la déhalogénéation du PCE sur des sites contaminés. C'est pour cette raison que des cultures enrichies sont utilisés non seulement sur des sites contaminés mais aussi en laboratoire lors de la purification d'enzymes (42, 46). Malgré certaines améliorations, nous verrons dans le cadre de ce projet les limites de l'utilisation de cette bactérie imposées notamment par sa faible croissance et sa susceptibilité à l'oxygène.

#### **1.4. Avantages et exemples de l'encapsulation de cellules**

##### **Définition**

L'encapsulation de cellules trouve ses origines dans les technologies d'immobilisation utilisées dans certains procédés industriels (37). Elle peut être décrite comme la séquestration des cellules dans une matrice polymérique ayant le plus souvent une forme sphérique. La matrice contient des pores à travers lesquels les nutriments, déchets métaboliques et autres molécules diffusent. En d'autres mots, les bactéries se retrouvent coincées à l'intérieur d'un filet de forme sphérique dont la taille des mailles détermine les molécules qui les traversent. En condition optimales, les cellules ne sont cependant pas distribuées uniformément dans les billes : elles auront tendance à croître en plus grand nombre près de la surface plutôt qu'au milieu (89). L'encapsulation a permis d'augmenter l'action de bactéries déjà utilisées (57, 74) et a permis le développement de nouvelles applications (19, 40, 88). Quelques exemples de polymères utilisés sont l'alginate, agar, chitosane, gomme gellan, gélatine, poly(éthène glycol), etc. Dans sa forme simplifiée, une encapsulation se fait à partir d'une solution liquide contenant le polymère ainsi que des cellules. À partir de cette solution que nous désignerons dans ce projet sous le nom de solution-mère, des gouttelettes sont formées puis ensuite gélifiées (« cross-link ») grâce à une réaction avec un agent chimique ou à un procédé physique comme un changement de température. L'encapsulation ne se limite pas qu'aux cellules : une grande variété de

médicaments, enzymes ou même des brins d'ADN ont déjà été encapsulés (19, 39, 63, 65). Dans la littérature, le terme microencapsulation est aussi retrouvé. Il s'agit en fait d'encapsulation où les particules gélifiées (i.e. les capsules) ont une taille à l'échelle du micromètre.

L'encapsulation de cellules comporte plusieurs avantages. Malheureusement, ces avantages rapportés dans la littérature sont bien souvent le fruit d'observations empiriques accompagnées d'hypothèses plutôt que la réelle démonstration des mécanismes responsables des effets. Nous observons aussi l'absence d'un modèle général et précis d'encapsulation qui permettrait d'établir avec certitude une liste des avantages et inconvénients de cette technique d'immobilisation. Par exemple, la grande variété des tailles de capsule ainsi que des polymères rend difficile l'utilisation des résultats d'un article scientifique pour l'étude d'un autre phénomène. Aussi, nous mentionnons dans la section suivante un manque de critères de référence dans la description des polymères utilisés. Ce même problème s'étend également à la description du mélange de polymère et de bactéries qui sert à l'encapsulation puisque la concentration des cellules (masse, densité optique, quantité de protéines, VSS) dans la culture utilisée est souvent manquante. Finalement, il est difficile de quantifier les cellules ou les co-substrats lorsqu'ils sont encapsulés puisque la matrice est souvent gélifiée de façon permanente. Nous tenterons ici de dresser un portrait général des avantages de l'encapsulation à travers la présentation d'exemples variées d'encapsulation dans les domaines de la médecine, industrie alimentaire, industrie pharmaceutique et environnement. Nous n'avons donc pas la prétention de donner les « avantages de l'encapsulation » mais bien de fournir au lecteur un aperçu des travaux où l'encapsulation de cellules a contribué de manière positive et d'identifier les observations qui se répètent dans des études semblables. Ces exemples et de nombreux autres ont influencé nos hypothèses de départ concernant l'encapsulation de *D. ethenogenes*.

## Médecine

Dans le domaine de la médecine, nous avons identifié les travaux de l'équipe menée par Thomas Ming Swi Chang comme étant les plus représentatifs. Dans ce domaine, l'encapsulation sert souvent à isoler les cellules des défenses immunitaires de l'hôte en gardant les anticorps à l'extérieur de la capsule. La matrice sert aussi à protéger le matériel encapsulé de l'acidité de l'estomac lors de l'administration orale. Dans une expérience (19), le chercheur nous décrit



l'encapsulation de cellules *E. coli* DH5 modifiées génétiquement pour exprimer le gène codant pour l'enzyme uréase : le noyau des billes contient des bactéries immobilisées dans une matrice d'alginate elle-même enveloppée d'une couche intermédiaire de polylysine, puis d'une couche finale d'alginate. À cette étape, il est intéressant de noter que 8,6 g de cellules encapsulées étaient aussi efficaces que 1,212 kg de microcapsules contenant de l'uréase-zirconium-phosphate pour éliminer l'urée contenue dans un bassin. Les bactéries encapsulées ont été administrées oralement à des rats sur une base quotidienne pendant 21 jours. Les rats utilisés présentaient à l'origine des dysfonctions rénales et leur niveau d'urée dans le plasma atteignait en moyenne 52,08%. Pendant ce traitement, les niveaux d'urée sont revenus à la normale à 9,10% et sont remontés après la fin des traitements.

Trois informations utiles peuvent être dérivées de cette expérience. Premièrement, la matrice polymérique a su protéger les cellules lors du passage dans le système digestif des rats, surtout au niveau de l'estomac où le pH est très bas. Deuxièmement, la matrice a permis des échanges de nutriments et de déchets métaboliques entre le système digestif des rats et l'intérieur des capsules. Troisièmement, il est raisonnable de penser que les cellules sont restées enfermées dans les capsules puisque les niveaux d'urée sanguins sont remontés après le passage de ces dernières. La variété de tailles possibles est aussi un argument intéressant pour la médecine puisque des microcapsules d'une taille variant entre 1 et 4  $\mu\text{m}$  ont déjà été utilisées. Ces capsules avaient la particularité de pouvoir passer du système digestif directement au système sanguin via les « Peyer's patches » (20, 36).

## Industrie

Pour les applications en industrie, nous avons retenu deux exemples, l'un pour le domaine alimentaire et l'autre pour l'industrie pharmaceutique. Pour le premier exemple, les cellules encapsulées sont des bactéries anaérobies de la famille *Bifidobacterium*, des bactéries connues pour leurs propriétés probiotiques (40). Les auteurs croyaient qu'en incorporant ces microorganismes à la nourriture, les clients bénéficieraient de plusieurs effets positifs comme une plus grande digestion des protéines, protection contre la colonisation de microorganismes pathogènes et une stimulation du système immunitaire. L'utilité de l'encapsulation était donc de développer un moyen de protection contre le milieu hautement acide de l'estomac afin que les

bactéries puissent atteindre les intestins. Les cellules de *Bifidobacterium* ont été encapsulées à l'aide de plusieurs types de polymères par la technique de « spray drying ». Ces polymères sont la gélatine animale, gomme arabique et un polymère d'amidon soluble. Les billes ont ensuite été plongées dans des bassins de solution acide à pH 2 et pH 3 pendant quatre heures afin de simuler les conditions de l'estomac. Nous pouvons observer dans les résultats les plus intéressants que seulement 2% des cellules libres exposées au pH de 2 ont survécues alors que ce chiffre s'élève à 76% dans le cas de cellules encapsulées dans de la gélatine. Une explication possible est l'interaction de la matrice avec les protons libres dans la solution acide.

Le deuxième exemple d'encapsulation dans l'industrie se situe dans la conversion de composés pour la fabrication d'antibiotiques (74). Le composé dihydroacétone phosphate sert à la synthèse de composés qui seront à leur tour utilisés, entre autres, pour la fabrication d'antibiotiques. La production de dihydroacétone phosphate se fait grâce à la conversion du L- $\alpha$ -glycérophosphate par l'enzyme glycérophosphate oxydase. Les auteurs utilisent donc dans leur système de base des bactéries d'*Aerococcus viridans* modifiées pour exprimer le gène *dak1* codant pour l'enzyme d'intérêt. Les cellules sont incubées dans des réacteurs en présence de L- $\alpha$ -glycérophosphate et le produit final est récupéré à la fin du procédé. Cette conversion semble simple mais malheureusement, du peroxyde d'hydrogène est aussi un produit de la réaction et inhibe l'activité de l'enzyme. La solution proposée : encapsuler les cellules en ajoutant dans la matrice l'enzyme catalase qui serait responsable de la dégradation du peroxyde d'hydrogène. L'avantage de cette intégration dans la matrice est que la catalase pourrait agir directement au site de production de l'inhibiteur. Les auteurs rapportent qu'après une expérience de conversion du L- $\alpha$ -glycérophosphate par des cellules d'*Aerococcus viridans* encapsulées dans une matrice d'alginate-polylysine-alginate en présence de catalase, l'efficacité de la conversion a atteint 98,5%.

Ces exemples démontrent une nouvelle fois l'effet protecteur d'une matrice polymérique face à un milieu ayant un pH très bas. Aussi, il est raisonnable de penser que des co-substrats comme des enzymes peuvent être ajoutés à la matrice. Aussi, il est suggéré que l'encapsulation des bactéries dans des réacteurs à opération continue minimise la perte des bactéries à croissance lente qui pourraient s'avérer utiles pour le bon fonctionnement du réacteur (76).

## **Biorémediation**

Un autre exemple d'application possible de l'encapsulation de cellules que nous voulons présenter se trouve dans l'amélioration de la biodégradation d'hydrocarbures aliphatiques de quatre à onze carbones (57). La problématique de la pollution des sols et de l'eau par les hydrocarbures est similaire à celle des éthènes chlorés puisque leur présence dans les sols et l'eau est souvent dû à leur grande utilisation et à des déversements accidentels (57). La problématique est aussi similaire dans le fait que les composés à transformer sont aussi toxiques pour les bactéries responsables de la transformation. Les auteurs ont d'abord isolés un consortium de bactéries à partir de sols contaminés par la gazoline. Ce consortium fut utilisé par la suite lors d'expériences de dégradation de la gazoline dans des échantillons de sols et d'eau contaminés. Le même consortium a aussi été encapsulé dans des microbilles de gomme gellan par la technique de gélification externe. En comparant l'activité de dégradation de cellules libres et cellules encapsulées, les auteurs ont notés plusieurs différences intéressantes lorsque la concentration de gazoline était grande (200 mg/L à 600 mg/L). Premièrement, les cellules libres ajoutées à ces échantillons contaminés nécessitent une période d'acclimatation de quelques jours avant de dégrader de façon significative les polluants. Ce délai n'a pas été nécessaire pour les cellules encapsulées. Ensuite, les cellules libres ont réussi à dégrader seulement 7% des hydrocarbures présent dans les échantillons de 600 mg/L alors que les cellules encapsulées ont dégradées 67% des polluants.

Nous pouvons proposer plusieurs hypothèses pour expliquer la différence de performance entre les cellules libres et les cellules encapsulées dans cet exemple. Premièrement, il est possible que la matrice agisse comme barrière de diffusion des hydrocarbures. Les cellules seraient donc exposées à des concentrations plus faibles de polluant (milieu moins toxique) et garderaient ainsi une activité de dégradation efficace. Deuxièmement, les auteurs de cette étude ont proposé que lors de la mort d'une cellule, la matrice empêche ou ralentit de façon significative la sortie du contenu intracellulaire de la cellule. Les autres cellules restent donc à proximité des débris cellulaires et peuvent les assimiler plus rapidement. D'autres avantages possibles de l'utilisation de cellules encapsulées pour la biorémediation sont une meilleure résistance à la compétition des organismes déjà présents dans le sol (agents antibactériens, prédation) et la formation d'une

barrière entre les bactéries et les particules de sols ce qui permettrait une meilleure diffusion de l'inoculum dans la zone contaminée.

### **Recherche et autres domaines**

Plusieurs autres démonstrations nous donnent un aperçu de l'étendue des possibilités offertes par l'encapsulation. L'une de celles-ci a été rapportée avec beaucoup d'enthousiasme par un groupe de chercheurs de Oregon State University (88). Les auteurs cherchaient une façon alternative de cultiver des microorganismes qui ne pouvaient survivre et se reproduire sur les milieux de culture traditionnels comme par exemple des plaques d'agar. Ils ont donc pensé à encapsuler des échantillons contenant ces microorganismes dans des microbilles d'agarose. Les billes ont ensuite été gardées dans des colonnes fermées aux extrémités par des filtres dont les pores ne laissaient pas passer les microbilles. Des cellules libres, nutriments et déchets cellulaires pouvaient passer librement. Les auteurs affirment que cette technique permettra de cultiver et étudier une grande variété de microorganismes marins.

Le dernier outil offert par l'encapsulation est la conservation des cellules. En effet, des cellules du bacille Calmette-Guerin ont été encapsulées dans des billes d'agarose puis congelées en utilisant du tréhalose comme cryoprotecteur (40). Les microcapsules sont restées stables après un entreposage de 12 mois et les cellules étaient viables.

Les deux exemples précédents soulignent un avantage important de l'encapsulation : les capsules deviennent des mini-contenants où les cellules peuvent se multiplier. Ces contenants sont perméables aux nutriments, imperméable aux autres cellules et sont assez stables pour être conservées. Les capsules peuvent donc devenir des outils pour le transport ou la culture de cellules. L'encapsulation pourrait aussi devenir un outil pour l'isolement de cellules. En effet, un échantillon dilué de bactéries peut être incorporé à une solution aqueuse d'alginate de sorte que lors de la formation des billes, une seule bactérie soit présente dans chaque bille. Par analogie avec l'isolement de bactéries sur des plaques d'agar, chaque cellule donnera naissance à une colonie et donc chaque bille serait susceptible de contenir un seul type de cellule. Avec cet outil, il serait possible de séparer et de cultiver en une seule étape tous les types de cellules contenus dans un échantillon liquide.

## **1.5. Polymères**

Il existe une grande variété de polymères qui ont été utilisés ou qui pourraient être théoriquement utilisés pour l'encapsulation de cellules. Ils sont le plus souvent regroupés en deux catégories à savoir les polymères naturels (retrouvés dans la nature) et les polymères artificiels (obtenus à la suite d'un traitement chimique par l'humain). Parmi les plus populaires se retrouvent l'alginate, la gomme gellan, l'acide poly-lactique, l'agarose, la chitosane et même le silicone (16, 65). Nous présenterons ici avec plus de détails ceux qui ont été utilisés dans le cadre du projet à savoir l'alginate et la chitosane.

### **L'alginate**

L'alginate est un polysaccharide naturel isolé à partir de plusieurs espèces d'algues brunes. Il est composé de  $\beta$ -D-acide mannuronique (M) lié en  $1 \rightarrow 4$  à  $\alpha$ -L-acide guluronique (G). La composition des blocs M et G ainsi que la longueur des brins de polymère peut varier selon le type d'algue et son stade de maturation (17, 69). À travers notre revue de la littérature, nous n'avons pu trouver de nomenclature définie pour l'alginate : les auteurs donnent le plus souvent le nom de leur fournisseur sans aucun détail supplémentaire. Pourtant, il apparaît que dans la plupart des échantillons disponible, deux caractéristiques importantes liées à la formation de la matrice, à savoir le poids moléculaire ainsi que la composition en blocs M et G, varient beaucoup (69). Par exemple, dans l'échantillon que nous avons sélectionné pour notre étude, Protanal LF10/60 (FMC biopolymers, Norvège), le poids moléculaire des brins est si varié que le fabricant indique plutôt la viscosité d'une solution aqueuse formée avec l'échantillon comme indice de la longueur moyenne des brins de polymères. Bref, dans le domaine de l'encapsulation, les études sont bien souvent des cas uniques en raison de l'échantillon d'alginate (ou autre polymère) choisi ce qui rend difficile toute tentative de généralisation. Malgré cet inconvénient, l'alginate est souvent utilisé pour l'encapsulation de cellules vivantes en raison de sa grande biocompatibilité. Il est aussi utilisé dans plusieurs applications en médecine malgré une certaine controverse au sujet de la probabilité que l'acide mannuronique puisse provoquer une réaction immunitaire chez l'hôte (19). Pour gélifier l'alginate, des cations divalents comme le calcium et

le barium sont utilisés. Les ions interagissent avec les blocs d'acide guluronique (d'où l'importance de spécifier la composition d'un échantillon) pour former des liaisons ioniques entre les différents brins (69). La propriété que ce polymère a pour former des complexes forts avec des cations a aussi été exploitée à d'autres fins comme par exemple dans la purification d'échantillons contenant l'enzyme glucoamylase (77). Des capsules d'alginate ont cependant un désavantage important : la gélification est réversible. La présence d'agents chélateurs comme l'acide citrique, l'acide lactique, ou un tampon phosphate dans le milieu où se trouvent les capsules accélèrent la dégradation de la matrice de gel en enlevant les ions divalents (20). Une solution vise à enrober des billes récemment formées avec de la polylysine afin de stabiliser la matrice (19). Une autre alternative à la polylysine est l'enrobement des billes d'alginate avec de la chitosane. Pour ce faire, des billes d'alginate sont d'abord formées puis sont ensuite plongées dans une solution contenant de la chitosane. L'alginate et les groupes chimiques amine sur la chitosane forment un complexe non-covalent qui augmente la durabilité des billes comparé à l'alginate seule (20).

### **La chitosane**

La chitosane est un dérivé de la chitine qu'on retrouve dans la carapace des crustacés et insectes (38). Elle est donc, tout comme l'alginate, un polymère abondant et facilement renouvelable. Dans certaines zones côtières, la chitine est même considérée comme un polluant (45). Par différents traitements, ce polymère naturel est transformé pour donner de la cellulose ou de la chitosane. Dans le cas de cette dernière, un groupe acétyle situé sur l'atome d'azote est enlevé par un traitement chimique avec NaOH. La figure suivante (figure 6) montre la structure de la chitine et de la chitosane.

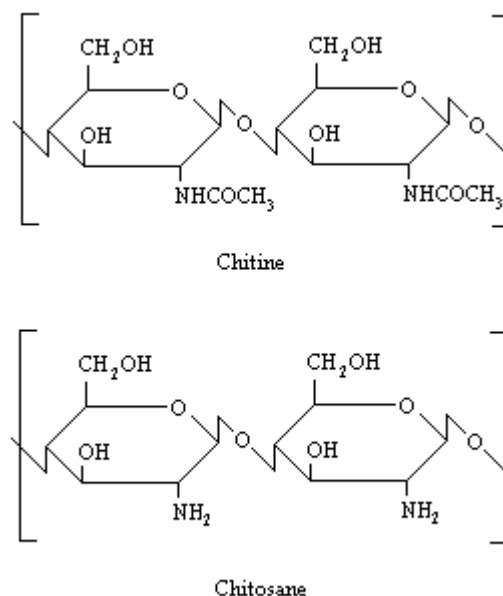


Fig. 6. Structure d'un brin de polymère de chitine et de chitosane. Lors du traitement de la chitine avec NaOH, le groupe acétyle relié à l'atome d'azote est enlevé.

Le traitement de déacétylation est rarement complet et il n'existe pas pour l'instant de nomenclature officielle pour décrire la chitosane obtenue à partir de la chitine (38). De manière plus exacte, la chitosane est en fait de la chitine avec un certain pourcentage de déacétylation ou un copolymère de N-acétyl-D-glucosamine et de D-glucosamine. Comme c'est le cas pour l'alginate, les auteurs des études scientifiques citent le plus souvent la source de chitosane utilisée accompagnée quelquefois du pourcentage de déacétylation sans donner plus de détails comme par exemple le poids moléculaire moyen. Il existe plusieurs applications à la chitosane : en photographie, en cosmétiques, en médecine, dans l'industrie alimentaire, dans l'industrie textile et aussi comme polymère pour l'immobilisation d'enzymes, de médicaments et de cellules, etc. Pour une révision complète des applications de la chitosane, nous vous invitons à consulter les travaux de Majeti et Ravi (45). Pour les applications liées à l'immobilisation et l'encapsulation, la chitosane est gélifiée avec du glutaraldéhyde, un composé toxique pour les cellules mais qui reste le composé le plus facile et le plus fiable (38). La gélification se fait lorsque les groupes aldéhyde de l'agent gélifiant réagissent avec les groupes amines sur la chitosane pour former un lien covalent (64). D'autres composés gélifiants avec des degrés de

biocompatibilité variés existent aussi : éthylènediamine, hexaméthènediamine, glyoxal etc. (35, 38) En plus des composés qui forment un complexe stable avec la chitosane, nous voulons rappeler le fait que l'alginate peut interagir avec la chitosane pour former un complexe non-covalent (20). Cette particularité sera d'ailleurs utilisée dans le cadre de ce projet. Finalement, le lignosulfonate peut aussi être utilisé comme agent gélifiant. La polymérisation de la chitosane à l'aide de lignosulfonate a encore un mécanisme peu connu puisque le lignosulfonate vendu commercialement n'a pas de structure bien définie. Cependant un modèle propose que les liens responsables de la gélification de la chitosane se forment grâce aux groupes amine situés sur la chitosane et les groupes sulfoniques situés sur le lignosulfonate (76).

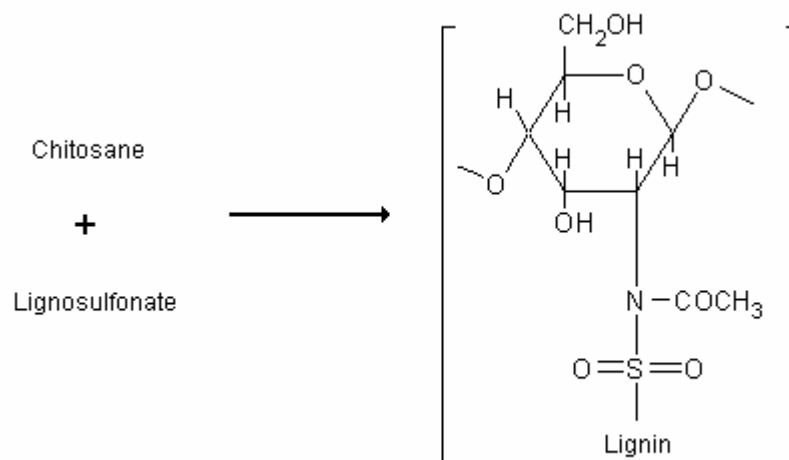


Fig. 7. Modèle proposé pour la gélification (cross-link) de la chitosane avec du lignosulfonate.

## **1.6. Méthodes d'encapsulation**

La méthode d'encapsulation choisie pour une application varie selon la taille des capsules, la nature du polymère, la nature du produit encapsulé. La plupart de ces méthodes produisent des billes avec une forme généralement sphérique ou une forme ressemblant à une goutte d'eau en chute. La précision concernant la taille peut aussi varier grandement ce qui peut



représenter un obstacle pour la constance entre les échantillons d'une même expérience. Bien que l'image abstraite d'une capsule soit une bille sphérique avec un diamètre défini, dans la pratique, les méthodes d'encapsulation permettent plutôt la formation d'échantillons de particules généralement sphériques avec une distribution de taille plus ou moins grande. Nous vous présentons ici les méthodes les plus connues pour l'encapsulation de cellules.

### **Drop-wise**

Cette méthode commune est souvent utilisée avec de l'alginate. Une solution liquide contenant un polymère et des cellules est d'abord formée puis déposée goutte-à-goutte à l'aide d'une seringue et d'une aiguille dans un bain où se fera la gélification. Dans le cas de l'alginate par exemple, le bain contient des ions calcium ou barium (2% m/v).

### **Coacervation**

L'encapsulation par coacervation débute par un mélange liquide dans lequel se trouvent les cellules et le polymère. La composition, la température ou le pH de la solution sont ensuite modifiés afin d'initier la formation d'une fine membrane non-gélifiée (aussi appelée pré-membrane) autour d'un noyau liquide appelé coacervat. Finalement, la pré-membrane est solidifiée par gélification ou évaporation de solvant. Il est important de noter que pour cette méthode, le coacervat et la pré-membrane ne doivent pas être tous deux hydrophobes ou hydrophiles. L'un doit être hydrophobe et l'autre hydrophile. C'est pourquoi des gélatines hydrophiles sont utilisées lors de l'immobilisation de coacervats hydrophobes comme de l'huile végétale ou certaines vitamines (19).

### **Émulsion**

Cette méthode s'apparente à la coacervation puisqu'elle utilise aussi la nature immiscible de réactifs hydrophiles et hydrophobes. Le mélange de départ peut contenir des cellules et des polymères le plus souvent de nature hydrophile (ex. polyamine, polyphénol, L-lidine, agar, gomme gellan, alginate) dans un solvant hydrophobe comme par exemple de l'huile de canola (58). Le mélange est agité de façon circulaire afin de former une émulsion où se retrouveront des billes d'huile entourées de blocs de polymères encore sous forme liquide. La membrane des capsules est ensuite formée par l'ajout de monomères hydrophobes (19), en changeant un

paramètre comme la température du mélange (23, 58, 88) ou par l'ajout d'autres composés initiant une réaction de gélification des ions de calcium pour l'alginate (17).

### **Atomisation**

Nous avons regroupé sous le thème atomisation les méthodes où un bec atomiseur est utilisé. Le protocole général d'encapsulation avec un atomiseur est semblable à la méthode du « drop-wise » puisqu'un mélange de cellules et de polymère est envoyé vers un outil qui a pour tâche de séparer le mélange en particules sphériques suivi d'une étape de gélification. Chaque système d'atomisation diffère donc dans la façon d'atomiser le mélange. Pour l'encapsulation de cellules, un atomiseur à air peut être utilisé. Une mince pellicule de solution liquide circule alors sur la paroi intérieure d'un tube à travers lequel passe un jet d'air pressurisé. À la sortie de l'atomiseur, la pellicule liquide est séparée en une multitude de particules sous la force de l'air. Un autre type d'atomisation est l'atomisation par vibrations incluant les vibrations ultrasoniques. Une fine pellicule du mélange est alors étalée sur une surface à la sortie de l'atomiseur (le bec) qui vibre. Les forces de vibrations causent la formation de crêtes et de creux sur la surface de la pellicule liquide qui se sépare ensuite en gouttelettes (71, 72). Finalement, certains atomiseurs séparent le mélange liquide grâce à des hélices ou des disques en rotation (9). Il est intéressant de noter ici qu'il existe un type d'appareil à atomisation par vibrations commercialisé par la compagnie Inotech Encapsulation (Dottikon, Suisse) où les particules qui quittent le bec de l'atomiseur passent à travers un champ électrique de 200-1800 volts. Lorsque de l'alginate est utilisé dans le mélange de départ, les billes se retrouvent chargées négativement et gardent une forme sphérique durant la chute dans le bain de calcium et au moment de l'impact avec la surface liquide du bain. Grâce à cette modification, l'appareil permet la production de billes parfaitement sphériques et la moyenne de taille la plus précise que nous ayons observé parmi les différents systèmes d'encapsulation évalués.

### **Spray-drying**

Bien que la méthode de « spray-drying » comprenne l'utilisation d'un atomiseur, nous ne l'avons pas inclus dans la description de la méthode d'atomisation. En effet, contrairement à l'atomisation où la forme des capsules est donnée suivi d'une gélification, la méthode du « spray drying » atomise et solidifie les capsules en une seule étape. La procédure commence avec la

formation d'une solution de cellules et de polymère dans un solvant. Le mélange est ensuite amené vers un atomiseur qui disperse le mélange en fine particules dans un jet d'air comprimé à haute température (75 °C à 160°C) (15, 26, 40). Le solvant contenu dans les particules s'évapore alors rapidement et des billes solides sont obtenues. En raison de plusieurs facteurs techniques comme par exemple l'évaporation rapide du solvant, les capsules obtenues sont de forme irrégulière et la formation d'agrégats est fréquente (17).

## 2. Hypothèses et objectifs

L'objectif de ce projet est de proposer un modèle stable de cellules bactériennes encapsulées pouvant servir à la déhalogénéation du PCE. Nous situons ce but dans une approche visant à obtenir une alternative pour la bioremediation des sites contaminés par les éthènes chlorés PCE, TCE, DCE et VC. Suite à la revue de nos connaissances sur l'encapsulation, nous pensons que l'encapsulation d'un consortium actif capable de convertir les éthènes chlorés offrirait des avantages multiples. Les avantages les plus importants seraient la protection du consortium contre des stress mécaniques, physiologiques (température) ou chimique (oxygène). Des avantages secondaires seraient une plus grande facilité de stockage ou facilité d'injection dans le sol. Notre premier but est donc de proposer un système fonctionnel où les bactéries encapsulées auraient une activité de déhalogénéation du PCE au moins semblable à des bactéries libres : les profils de déhalogénéation du PCE par les cellules encapsulées devront montrer une vitesse apparente de disparition du PCE et une vitesse d'accumulation d'éthène semblables aux cellules libres. Un objectif secondaire est que ce modèle soit développé en vue d'être utilisé à grande échelle pour des applications sur des sites contaminés par des éthènes chlorés et plus particulièrement des sites contaminés par du PCE et TCE. Ce deuxième objectif influencera nos décisions quand aux polymères et procédés utilisés pour l'encapsulation. Suite à la révision des connaissances sur la déhalogénéation des éthènes chlorés et de l'encapsulation de cellules, nous avons constaté la grande diversité des approches possibles pour accomplir ces objectifs. Nous disposons par exemple d'une longue liste de polymères et de méthodes d'encapsulation nous permettant d'encapsuler les cellules. Cependant, la grande diversité des polymères utilisés combiné à l'absence d'informations détaillées sur ces derniers peuvent représenter un obstacle lorsque vient le temps de trouver des points de repères pour notre projet à partir des résultats disponibles dans la littérature. Il devient important de poser dès le début du projet des balises claires pour encadrer les deux aspects importants du projet à savoir la culture de bactéries et le procédé d'encapsulation.

Premièrement, nous voulons utiliser une culture enrichie de *D. ethenogenes* pour convertir le PCE en éthène. L'utilisation d'une culture mixte plutôt qu'une culture pure devrait nous permettre d'utiliser des bactéries métaboliquement actives sans nécessiter l'ajout de

mélanges complexes. Le problème du ou des facteurs manquants pour la survie de *D. ethenogenes* serait alors contourné et une culture « autosuffisante » aurait de meilleures chances de survie dans les sols contaminés. Les bactéries recevront un apport régulier de nutriments pour assurer leur survie : PCE comme accepteur d'électrons et acide lactique comme donneur indirect d'électrons et source de carbone. Les plus grands obstacles et interrogations posés par cette culture tout au long du projet sont de savoir si nous pourrions développer un protocole afin de maintenir l'efficacité de déhalogénéation des bactéries encapsulées et si nous pourrions accomplir toutes les manipulations voulues sachant que la culture est sensible à l'oxygène. Comme la culture contient une très grande variété de bactéries, il nous est impossible dans le contexte de ce projet de connaître toutes les interactions entre les cellules. Si nous observons une différence entre le profil de déhalogénéation du PCE par des bactéries encapsulées et par des bactéries libres, il sera plus difficile d'apporter une réponse claire aux observations : nous ne pourrions entre autres distinguer les effets attribuables à la matrice polymérique (ex. concentration des cellules dans un espace restreint) des effets plus spécifiques aux interactions entre les cellules encapsulées (ex. une bactérie essentielle à l'équilibre de la colonie est détruite pendant l'encapsulation). Concernant la sensibilité de la culture à l'oxygène, la culture est en fait si sensible que des traces d'oxygène à peine détectables par un colorant comme la résazurine sont suffisantes pour altérer de façon permanente le profil de déhalogénéation du PCE (résultats présentés dans ce projet). La plupart des manipulations devront donc être effectuées en atmosphère contrôlée. Finalement, un élément important concernant la culture est que nous devons proposer un système efficace permettant de la maintenir active, incluant la nature des substrats à ajouter et leur fréquence.

Deuxièmement, nous voulons encapsuler les cellules et il faudra choisir le système d'encapsulation ainsi que les polymères à utiliser. Le premier modèle de capsules que nous pensons développer est des microcapsules d'un diamètre variant entre 10  $\mu\text{m}$  et 100  $\mu\text{m}$ . La taille visée est importante puisque des échantillons de capsules ayant une taille moyenne de 50  $\mu\text{m}$  et moins peuvent diffuser lentement dans plusieurs types de sols (56). Nous voulons aussi que les capsules soient durables afin que les effets protecteurs durent le plus longtemps possible lorsque les cellules seront dans un milieu contaminé. L'utilisation d'alginate pour les capsules est donc à éviter puisque la gélification est réversible sauf lorsque la matrice est stabilisée comme nous

avons vu précédemment avec des capsules d'alginate enrobées de polylysine (19). Ce sont donc les tests avec la chitosane qui seront favorisés en premier puisqu'il s'agit d'un dérivé d'un biopolymère naturel, disponible à faible coût et que sa gélification est durable. Il est intéressant de noter qu'en utilisant ce polymère à grande échelle nous pourrions contribuer à la valorisation d'un produit souvent considéré comme un rejet de la transformation de produits de pêche. L'alginate stabilisé par un enrobage à la chitosane sera envisagé comme alternative. Le choix de la méthode d'encapsulation a été arrêté sur les systèmes d'atomisation. Nous pensons que l'atomisation pourra nous permettre de fabriquer des capsules de la taille voulue tout en étant facile à reproduire sur une grande échelle : il suffit d'augmenter le nombre d'atomiseurs pour augmenter la production. Dans le cas où nous ne pourrions développer un système d'encapsulation par atomisation viable pour la culture, nous envisageons comme alternative la méthode du « drop-wise » qui est plus simple et plus souvent rapportée dans la littérature.

Enfin, l'ensemble de ces hypothèses s'inscrivent dans une démarche visant à produire un protocole d'encapsulation de cellules bactériennes métaboliquement actives capables de convertir le PCE en éthène. Nous utiliserons donc une culture enrichie en *D. ethenogenes* afin de contourner le problème du ou des facteur(s) manquant(s). Le polymère qui sera favorisé en premier est la chitosane. L'utilisation de l'alginate seule et l'alginate enrobée est également envisagé. Aussi, nous tenterons de développer un protocole d'encapsulation qui nous permettrait de fabriquer des capsules d'un diamètre entre 10  $\mu\text{m}$  et 100  $\mu\text{m}$  en considérant la technique de « drop-wise » comme la dernière alternative. Finalement les développements des deux volets, qui sont d'une part les cellules bactériennes et d'autre part la méthode d'encapsulation, seront faits en parallèle pour assurer une compatibilité entre l'activité métabolique des cellules et les conditions d'encapsulation lors des expériences réalisées avec les différents montages d'encapsulation.

## 3. Matériel et Méthodes

### 3.1. Polymères

#### **Alginate**

L'alginate a été obtenu de la compagnie FMC biopolymers (Norvège) sous le nom de Protanal LF10/60, un polymère d'alginate de sodium à forte proportion en acide guluronique (65% à 75%) et une faible viscosité de 20 cps à 70 cps (1% m/v en solution). La formation de particules solides s'est fait au contact d'une solution gélifiante contenant 2% (m/v) de  $\text{CaCl}_2$ . L'alginate obtenu était sous la forme d'une poudre et une solution liquide fraîche a été préparée pour chaque encapsulation dans une solution saline (0,9% NaCl). Pour la préparation d'un mélange sans oxygène, la solution a été bouillie pendant 10 min puis barbotée avec de l'azote pur. L'alginate en solution a ensuite été stérilisé à 121°C et 15 psi pendant 20 minutes.

#### **Chitosane**

La chitosane a été obtenue chez Marinard Biotech (Canada) sous le nom de KITOMER. Elle a été isolée à partir de *Pandalus Borealis* et avait un degré de déacéthylation de 88% et une viscosité de 33 cps (1% m/v en solution). Pour chaque encapsulation, les flocons ont été dissous dans une solution saline (0,9% NaCl) contenant 1% (v/v) d'acide acétique. Pour la préparation d'un mélange sans oxygène, la solution a été bouillie pendant 10 min puis barbotée avec de l'azote pur. La chitosane en solution a ensuite été stérilisée à 121°C et 15 psi pendant 20 minutes.

#### **Lignosulfonate**

Le polymère complexe nous a été fourni par la compagnie LignoTech USA Inc (États-Unis) sous le nom de BORRESPERSE NA POWDER. Le lignosulfonate en poudre a été dissous dans une solution saline (0,9% NaCl) avant chaque expérience d'encapsulation. Le pH a été ajusté à 8,0 avec du NaOH 1M. Pour la préparation d'un mélange sans oxygène, la solution a été bouillie pendant 10 min puis barbotée avec de l'azote pur. Le lignosulfonate en solution a ensuite été stérilisé à 121°C et 15 psi pendant 20 minutes.

### **3.2. Cultures cellulaires**

#### ***Escherichia coli***

Les cultures de ces bactéries étaient utilisées dans certains tests visant à estimer la survie des cellules bactériennes au procédé d'encapsulation. Les souches furent gardées au congélateur à  $-70^{\circ}\text{C}$ . Les bactéries étaient ensuite placées en croissance dans des flasques de 500 ml contenant un milieu de culture dont la composition par litre était de 12,8 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 3,0 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g  $\text{NaCl}$ , 2,5 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,49 g  $\text{MgSO}_4 \bullet 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0,015 g  $\text{CaCl}_2 \bullet 2 \text{H}_2\text{O}$ , 0,01 g Thiamine, 0,01 g  $\text{FeSO}_4 \bullet 7 \text{H}_2\text{O}$  et 7,5 g dextrose. Le pH était ajusté à 7,4 avec une solution de  $\text{NaOH}$  1M, puis le volume final de la solution était ajusté à 1 litre avec de l'eau distillée. La stérilisation du milieu de culture se faisait à  $121^{\circ}\text{C}$  et 15 psi pendant 20 minutes avant l'inoculation. Les cultures ont été laissées en croissance dans un incubateur à  $30^{\circ}\text{C}$  et une agitation de 150 rpm pendant environ 20 heures avant utilisation.

#### ***Culture enrichie en Dehalococcoides ethenogenes***

Nous n'avons pas utilisé de bactéries *D. ethenogenes* en culture pure en raison du problème posé par le composé inconnu mentionné plus tôt. Nous avons plutôt opté pour un consortium enrichi en *D. ethenogenes*: culture KB1 (Georgia Institute of Technology, États-Unis). Ce consortium offre la possibilité d'une déhalogénéation complète du PCE tout en minimisant les ajouts de nutriments complexes d'une culture pure. Les cultures de KB1 ont été maintenues dans un milieu défini dont la composition par litre est de 10 ml d'une solution de sels ( 100 g  $\text{L}^{-1}$   $\text{NaCl}$ , 50 g  $\text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2 \bullet 6\text{H}_2\text{O}$ , 20 g  $\text{L}^{-1}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 30 g  $\text{L}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 30 g  $\text{L}^{-1}$   $\text{KCl}$ , 1,5 g  $\text{L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2 \bullet 2\text{H}_2\text{O}$ ), 1 ml d'une solution d'éléments en trace ( 10 ml  $\text{L}^{-1}$   $\text{HCl}$  solution 25% m/m, 1,5 g  $\text{L}^{-1}$   $\text{FeCl}_2 \bullet 4 \text{H}_2\text{O}$ , 0,19 g  $\text{L}^{-1}$   $\text{CoCl}_2 \bullet 6 \text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g  $\text{L}^{-1}$   $\text{MnCl}_2 \bullet 4 \text{H}_2\text{O}$ , 70 mg  $\text{L}^{-1}$   $\text{ZnCl}_2$ , 6 mg  $\text{L}^{-1}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 36 mg  $\text{L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \bullet 2 \text{H}_2\text{O}$ , 24 mg  $\text{L}^{-1}$   $\text{NiCl}_2 \bullet 6 \text{H}_2\text{O}$ , 2 mg  $\text{L}^{-1}$   $\text{CuCl}_2 \bullet 2 \text{H}_2\text{O}$  ), 1ml de solution Se/Wo ( 6 mg  $\text{L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \bullet 5 \text{H}_2\text{O}$ , 8 mg  $\text{L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{WO}_4 \bullet 2 \text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g  $\text{L}^{-1}$   $\text{NaOH}$ ), 0,25 ml d'indicateur coloré (1% rezazurin), 0,53 ml d'une solution d'acide lactique (85% m/v) et 2,52 g de  $\text{NaHCO}_3$ . Le volume final a été ajusté à un litre avec de l'eau déionisée, la solution était ensuite été bouillie pendant 5 minutes puis barbotée avec un



mélange gazeux d'azote et de CO<sub>2</sub> (80/20, N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>) jusqu'à l'obtention d'un pH entre 7,2 et 7,3 à la température ambiante (~23°C). La solution était versée dans des bouteilles en verre de 500 ml fermées hermétiquement avec des bouchons de butyle (Geo-Microbial Technologies, États-Unis). Finalement, une solution réductrice (2 mM L-cystéine, 2 mM Na<sub>2</sub>S x 9H<sub>2</sub>O) était ajoutée dans une proportion de 1 ml par litre de milieu et le milieu de culture complet était stérilisé à 121°C et 15 psi pendant 20 minutes. L'ajout du PCE s'est fait en injectant une solution-mère contenant 8% (v/v) de PCE dilué dans l'éthanol pour obtenir une concentration initiale de 100 µM de PCE. Les bouteilles ont été placées dans un agitateur à une vitesse de 100 rpm. Une culture de bactéries avec une densité optique initiale à 600 nm d'environ 0,10 recevait une nouvelle dose de 100 µM de PCE et 5 mM d'acide lactique à toutes les semaines. Après 3 à 4 semaines (entre 21 et 27 jours), la culture atteignait la densité optique à 600 nm de 0,35 ce qui était une valeur suffisante pour commencer une expérience d'encapsulation ou pour inoculer un nouveau milieu afin de propager le consortium.

### **Récolte des cellules et préparation de la solution-mère**

La récolte des cellules bactériennes est une étape qui se faisait avant une expérience d'encapsulation et, pour le consortium KB1, avant d'ensemencer un nouveau milieu. L'objectif de cette manipulation était de former une solution hautement concentrée en bactéries. La récolte commençait par une vérification de la densité optique de la culture avec un spectrophotomètre réglé à 600 nm. Les échantillons ont été mesurés tel quels et aussi sous une forme diluée dans une proportion 50 : 50 dans le milieu de culture stérile utilisé pour la croissance. Toutes les mesures ont été prises en triplicata et l'échantillon contrôle était le milieu de culture stérile. Les cultures ont été centrifugées à 3000 g pendant 15 minutes. Le surnageant était éliminé et le culot resuspendu dans une solution saline (0,9% NaCl). Le volume de solution saline utilisé variait selon la densité optique finale voulue. Une vérification finale de la densité optique était faite et le milieu de culture était utilisé pour diluer les échantillons dont la valeur de densité optique était supérieure à 0,9. Le terme solution-mère désigne toute solution liquide contenant un polymère envoyé vers l'atomiseur dans le but de former des capsules. Pour plusieurs tests, la solution-mère était un mélange stérile formé uniquement d'une solution de polymère. Cependant, lors des expériences d'immobilisation de cellules bactériennes, la solution-mère contenait aussi des cellules métaboliquement actives. La préparation d'une solution-mère était faite à partir de la

solution obtenue immédiatement après la récolte des cellules. Le volume de la solution de cellules bactériennes était ajusté afin qu'elle contienne une biomasse équivalente à 3 mg/ml de protéines. Un volume identique d'une solution fraîche d'alginate 4% (m/v) était aussi préparé dans une solution saline stérile. Le mélange final était assemblé en versant les deux solutions simultanément dans une bouteille stérile fermée hermétiquement et gardée sur glace jusqu'à son utilisation.

### **3.3. Premier montage : microencapsulation par atomisation avec jet d'air**

#### **Description**

Le premier montage proposé produisait des capsules par atomisation avec jet d'air. La figure 8 montre le montage où la pièce principale est un atomiseur à jet d'air (SESNZ-035HA00, TurboSonic Technologies Inc, USA) à travers lequel un mince film de liquide était atomisé par le passage d'air pressurisé. La bouteille d'air comprimé contenait de l'air stérile et elle était reliée par un tube de Norprene à un tube d'acier fixe de 3 mm qui servait aussi de support à l'atomiseur. La solution-mère se trouvait dans une bouteille de 500 ml fermée d'où partaient deux tubes de Norprene : l'un était équipé d'un filtre stérile de 0.22 µm (Millipore, Irlande) et l'autre était le tube d'alimentation principal à travers lequel a été injecté le « master mix ». Une pompe péristaltique (Gilson Manipuls 3 de Gilson, Villiers-le-Bel, France) a été utilisée afin d'amener la solution-mère vers l'atomiseur. Ce dernier était suspendu dans un flasque de 6 litres au-dessus de la solution gélifiante. Un tube de Norprene équipé d'un filtre stérile de 0,22 µm servait à évacuer l'air hors du flasque. Finalement, la solution-mère et la solution gélifiante étaient agités grâce à des barreaux magnétiques et des plaques agitatrices.

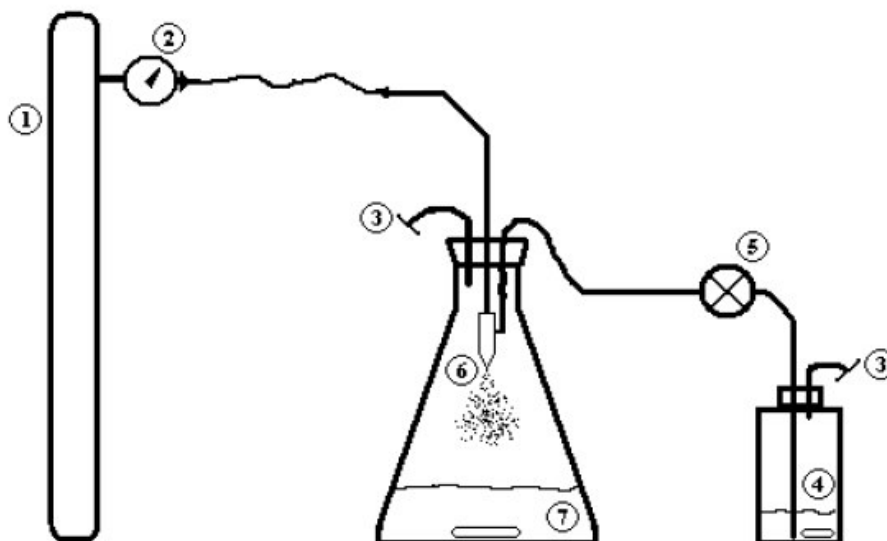


Fig. 8. Schéma du montage d'encapsulation avec jet d'air : 1) Cylindre de gaz comprimé, 2) Manomètre, 3) Tubes d'aération pour la sortie ou l'entrée d'air équipées de filtres, 4) Master mix dans une bouteille de 500 ml, 5) Pompe péristaltique, 6) Atomiseur, 7) Solution gélifiante agitée grâce à un barreau magnétique.

### Protocole d'encapsulation

La plupart des sections du montage (tubes, bouteille, flasque, barreaux magnétiques, atomiseur) étaient assemblées et autoclavées à 121°C et 15 psi pendant 20 minutes. Ensuite, les filtres et le tube de Norprene joints au cylindre d'air comprimés étaient reliés au montage en conditions stériles. L'ajout de 600 ml de solution gélifiante et de solution-mère dans leur contenant respectifs fut aussi fait en conditions stériles. Une fois le processus d'encapsulation démarré, l'air était amené dans le flasque de 6 litres avec une faible pression et le fonctionnement des tubes d'aération était confirmé. La pression d'air était ensuite ajustée à la valeur voulue entre 50 et 70 psi. La vitesse d'agitation du barreau magnétique de la solution gélifiante était ajustée afin d'éviter la formation d'un vortex qui pourrait déformer les particules liquides arrivant dans la solution. Le démarrage du montage était terminé par la mise en action de la pompe péristaltique. Durant les premières secondes, il était normal que les particules

éjectées soient plus grandes et difformes que prévues : l'atomiseur éjectait le mélange de façon sporadique. Un flot continu de particules éjectées était ensuite observé et avait l'aspect d'une fine brume. Il est préférable de ne pas interrompre une atomisation en cours puisque l'atomiseur produirait une nouvelle fois des particules difformes lors de l'arrêt et au redémarrage. Une fois l'atomisation terminée, les particules étaient filtrées à travers un filtre de mailles d'acier dont les pores sont de 0,8 mm puis filtrées une deuxième fois à travers un filtre de nylon (120  $\mu\text{m}$ , Millipore). La première filtration éliminait les agrégats de gels incluant les particules difformes éjectées au début de l'atomisation. La deuxième filtration éliminait les billes avec un diamètre supérieur à 120  $\mu\text{m}$ . Finalement, le lavage des billes s'est fait dans une bouteille de 500 ml contenant 200 ml d'une solution de 0,1%  $\text{CaCl}_2$ . Le mélange était laissé 30 minutes à décanter puis le surfactant était éliminé. L'opération de lavage était ensuite répétée.

### **3.4. Second montage : microencapsulation par atomisation ultrasonique**

#### **Description**

Le deuxième montage était enfermé dans une boîte en plastique (1 m x 0,6 m x 0,8 m) dans laquelle l'air était remplacé par une atmosphère composée uniquement d'azote. Deux gants en caoutchouc situés à l'avant de la boîte permettaient à l'utilisateur situé à l'extérieur de manipuler les objets à l'intérieur. Le deuxième montage se distingue par le fait qu'un atomiseur à ultrasons a été utilisé. L'appareil comporte deux pièces principales : l'atomisateur et le générateur. La première pièce est un atomiseur à bec conique capable d'un débit maximal de 1,2 ml par seconde et produisant des vibrations à 48 kHz (8700-48 Ultrasonic Atomizing Nozzle, Sono-Tek, É-U). L'atomiseur était relié au générateur qui convertissait l'énergie électrique à la fréquence voulue (Broad band Ultrasonic Generator, Sono-Tek, É-U). Le générateur permettait de modifier la puissance de l'appareil afin d'obtenir une atomisation plus régulière selon la viscosité et le débit de la solution à atomiser. Cette dernière se trouvait dans une seringue en plastique jetable de 60 ml et une pompe à seringue (Harvard Apparatus, É-U) a été utilisée afin d'acheminer le mélange vers le bec de l'atomiseur *via* un tube de Norprene. Ce bec était suspendu dans l'ouverture d'une bouteille de plastique de 5 litres de façon à ce que les particules

de gel soient éjectées le plus loin possible de la surface intérieure de la bouteille. La solution gélifiante était agitée grâce à un barreau agitateur.

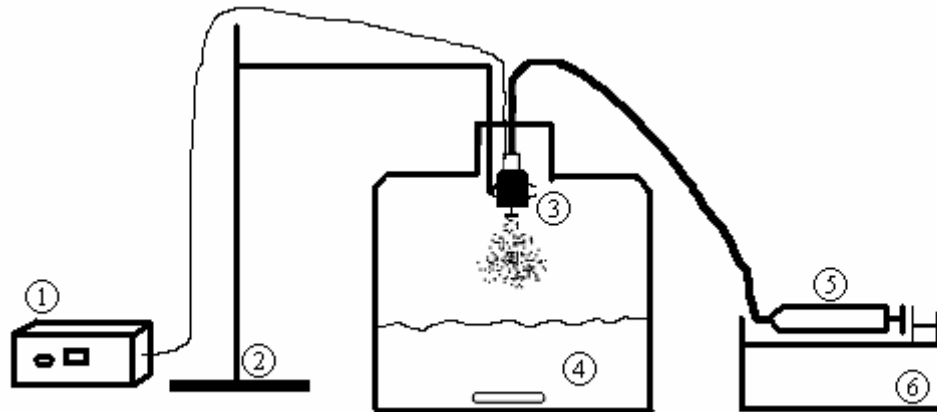


Fig. 9. Schéma du montage d'encapsulation avec vibrations ultrasoniques : 1) Générateur , 2) Support en acier, 3) Atomiseur, 4) Solution gélifiante agitée grâce à un barreau magnétique, 5) Seringue de 60 ml dans laquelle se trouve le master mix, 6) Pompe à seringue

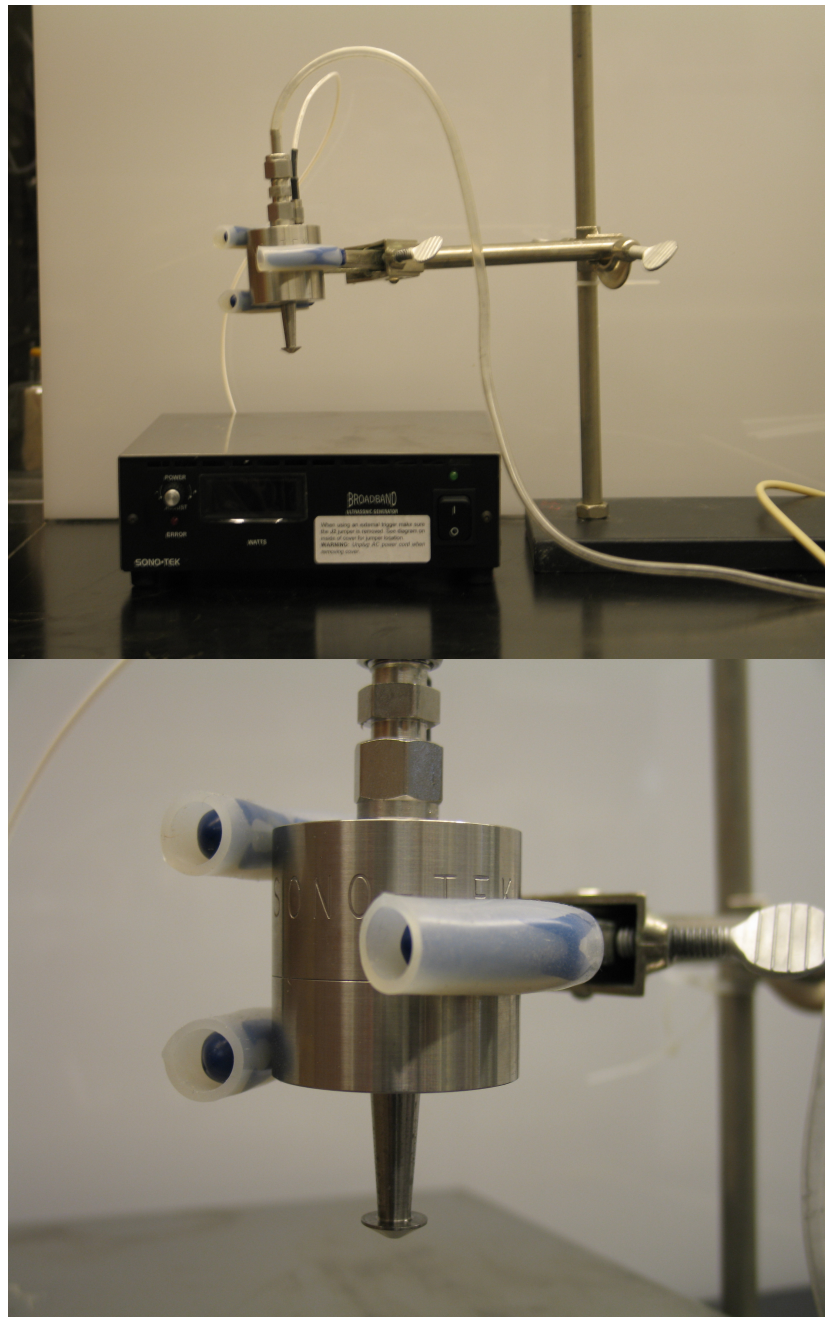


Fig. 10. Photographies montrant l'atomiseur et le générateur. En haut, l'atomiseur est relié au tube d'alimentation qui sort à droite de la photographie et par lequel est acheminé le master mix. Le générateur est la boîte noire. En bas, photographie de l'atomiseur : le bec de l'atomiseur est la structure conique inversée située en bas de la pièce.

## **Protocole d'encapsulation**

Avant l'assemblage final des composantes du montage, les tubes, bouteille, support, barreau magnétique étaient autoclavés à 121°C et 15 psi pendant 20 minutes. Tout le matériel et les solutions utilisés pendant l'encapsulation ont été enfermés dans la boîte. Les murs intérieurs étaient lavés avec un mélange d'éthanol à 70% et l'air remplacé par de l'azote pur. Avant le début de l'expérience, l'air à l'intérieur de la boîte était pompé à travers un tube de 50 ml contenant de la laine de cuivre chauffée afin d'éliminer les traces d'oxygène. L'atomisation débutait par la mise en fonction de l'atomiseur suivie de la pompe péristaltique. Comme pour le premier montage, l'agitation de la solution gélifiante était ajustée afin de ne pas créer un vortex qui aurait eu pour effet de déformer les particules avant leur gélification. La puissance de l'appareil a aussi été ajustée afin d'obtenir une atomisation régulière du liquide : si cette puissance était trop faible, le liquide ne serait pas atomisé et s'accumulerait sur le bec et si la puissance était trop forte, les particules ne seraient pas éjectées de manière régulière. L'atomisation pouvait être arrêtée à tout moment sans qu'il y ait d'éjection irrégulière. La plupart des expériences ont été réalisées avec un débit de liquide dans le bec entre 1 ml/min et 3 ml/min et une intensité des ondes de 3,5 watts à 5,0 watts. Une fois l'atomisation terminée, les particules étaient filtrées à travers un filtre de mailles d'acier dont les pores sont de 0,8 mm puis filtrées une deuxième fois à travers un filtre de nylon (120 µm, Millipore). La première filtration éliminait quelques rares agrégats de gels qui auraient pu se former pendant l'atomisation. La deuxième filtration éliminait les billes avec un diamètre supérieur à 120 µm. Finalement, les capsules ont été lavées à deux reprises par l'ajout de 200 ml d'une solution de 0,1% (m/v)  $\text{CaCl}_2$  suivie d'une décantation dans une bouteille de 500 ml.

### **3.5. Troisième montage : encapsulation avec la technique du « drop-wise »**

#### **Description**

Le troisième montage se distingue des deux premiers par le fait que les capsules formées avaient un diamètre dans l'échelle des millimètres contrairement à quelques dizaines de micromètres. La taille du matériel utilisé nous permettait aussi de réaliser l'expérience dans une tente anaérobie flexible de type C (Coy laboratory products Inc., États-Unis). L'outil utilisé en

guise d'atomiseur était une seringue stérile de 60 ml jetable équipée d'une aiguille 26 G, elle aussi stérile et à usage unique. La solution gélifiante était gardée dans un bécher de 200 ml et agitée grâce à un barreau agitateur.

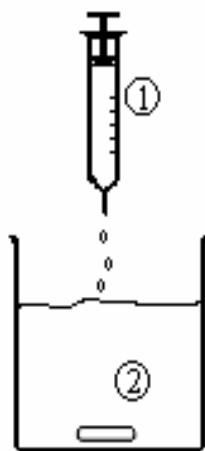


Fig. 11. Schéma du montage d'encapsulation par « drop-wise » : 1) Seringue dans laquelle se trouve le master mix, 2) Solution gélifiante agitée grâce à un barreau magnétique

### Protocole d'encapsulation

Le matériel et les solutions étaient stérilisés à 121°C et 15 psi pendant 20 minutes et placés dans la tente 16 heures avant leur utilisation pour minimiser la contamination par des traces d'oxygène. La fabrication des capsules commençait par l'ajustement de la vitesse d'agitation de la solution gélifiante. La solution-mère était ensuite placée dans la seringue. L'opérateur plaçait la seringue en position verticale au-dessus de la solution gélifiante de façon à ce que l'aiguille se trouve à environ 5 cm de la surface du liquide. D'une légère pression du doigt, la solution-mère était déposée goutte à goutte (débit approximatif de deux gouttes par seconde) dans le bain gélifiant. Une fois cette opération terminée, les billes étaient laissées dans le bain pour une période de 10 minutes. Les billes ont été filtrées avec un filtre de mailles d'acier dont les pores sont de 0,8 mm. Finalement, les billes ont été lavées en versant 200 ml d'une solution de 0.1%  $\text{CaCl}_2$  directement sur les billes à la surface du filtre.



### **3.6. Enrobage à la chitosane**

Lors de plusieurs expériences, les billes d'alginate, dont la gélification est réversible, ont été stabilisées suite à un enrobage avec le polymère chitosane. Les billes d'alginate lavées obtenues à partir d'environ 50 ml de solution-mère étaient placées dans 100 ml d'une solution saline (0,9% NaCl). À ces billes en solution étaient ajoutés 100 ml d'une solution de 2% (m/v) de chitosane préparée dans une solution saline et 1% (v/v) d'acide acétique. Le mélange ainsi formé était agité doucement (50 rpm) sur une plaque agitatrice pendant 30 minutes pour laisser la chitosane interagir avec l'alginate à la surface des capsules. L'enrobage était stabilisé en polymérisant la chitosane avec du lignosulfonate. Pour se faire, les capsules enrobées et lavées avec une solution saline étaient resuspendues dans un volume de 100 ml de solution saline. Un volume de 100 ml de 20% (m/v) lignosulfonate préparée dans une solution saline était ensuite ajouté et le mélange était agité doucement (50 rpm) sur une plaque agitatrice pendant 30 minutes. Finalement, les capsules étaient lavées trois fois avec une solution saline ou jusqu'à ce que coloration brune dû au lignosulfonate disparaisse.

### **3.7. Contamination volontaire par l'oxygène**

Les échantillons de cellules libres et cellules encapsulées ont été préparés comme lors de la détermination du profil de déhalogénéation du PCE (voir méthodes d'analyse). À l'aide d'une seringue analytique en verre étanche, un volume d'oxygène pur a été injecté dans les échantillons immédiatement après l'ajout du PCE. Les échantillons contrôles étaient des cellules bactériennes non-exposées à l'oxygène et des échantillons qui contenaient uniquement le milieu défini stérile.

### **3.8. Méthodes d'analyse**

#### **Absorption**

Les tests d'absorption du PCE sur différents polymères, nanotubes de carbone et poudre de charbon ont été faits dans des bouteilles en verre de 60 ml contenant 20 ml de solution saline

stérile et fermées hermétiquement avec des bouchons de butyle (Geo-Microbial Technologies, États-Unis) après l'ajout des échantillons. Les bouteilles contrôles ne contenaient que la solution saline stérile. Les bouchons utilisés ont été scellés par une mince couche de téflon afin de réduire l'absorption de PCE. Tous les échantillons étaient préparés en duplicata ou triplicata et utilisés pour un seul prélèvement (bouteilles sacrifice) dans le but de réduire les pertes de PCE à travers le bouchon perforé par la seringue servant aux prélèvements. Une solution concentrée de PCE était préparée en diluant 80 µl de PCE dans de l'éthanol pur pour un volume total de 1 ml. Le temps zéro correspondait au moment où un volume donné de la solution de PCE était ajouté aux bouteilles afin d'obtenir une concentration finale dans la bouteille (phase gazeuse + phase liquide) de 25 µM, 50 µM ou 100 µM. Un volume de 300 µl de l'espace de tête était prélevé périodiquement et analysé par chromatographie en phase gazeuse.

### **Profils de déhalogénéation du PCE**

Les tests de déhalogénéation du PCE par le consortium de bactéries enrichi en *D. ethenogenes* ont été faits dans des bouteilles en verre de 120 ml. Les bouteilles étaient d'abord stérilisées à 121°C et 15 psi pendant 20 minutes et placées dans une tente anaérobie 16 heures avant leur utilisation pour minimiser la contamination par des traces d'oxygène. À chaque bouteille était ajouté 80 ml d'un milieu défini stérile et libre de trace d'oxygène dont la composition par litre et les étapes de préparation ont été mentionnées dans la section 2.2. Les cellules bactériennes libres ou encapsulées étaient ensuite ajoutées puis les bouteilles étaient scellées avec des bouchons de butyle (Geo-Microbial Technologies, États-Unis) recouverts d'une mince couche de téflon afin de réduire l'absorption de PCE. Les échantillons et contrôles contenant uniquement le milieu défini stérile ont été préparés en duplicata ou triplicata. Les bouteilles étaient placées dans un agitateur à une vitesse de 100 rpm et la composition des gaz présents dans l'espace de tête était analysée périodiquement par chromatographie en phase gazeuse.

### **Protéines**

Pour déterminer la concentration de protéines dans les échantillons, l'ensemble «DC Protein Assay Reagents Package» (# 500-0116, BioRad, États-Unis) a été utilisé. Cet ensemble

permettait de déterminer la concentration de protéines grâce à une réaction colorimétrique dérivée du test de Lowry. Une nouvelle courbe de calibration a été préparée avant chaque test avec des étalons de protéines bovines fournies avec l'ensemble. La réaction colorimétrique se faisait avec des échantillons de 100 µl en triplicata et la densité optique était déterminée avec un spectrophotomètre à 750 nm. Avant de commencer la réaction, les membranes cellulaires des protéines étaient d'abord dissoutes dans un tampon de lyse. Ce tampon était préparé dans un volume total de 100 ml d'eau déionisée et contenait 0,12 g de Tris, 0,88 g de NaCl, 0,029 g EDTA, 0,30 g SDS et 1,0 ml de Triton X-100.

### **Unités de formation de colonies**

Des dilutions successives d'un facteur de 10 ( $10$  à  $1 \times 10^8$ ) ont été préparées à partir de 100 µl d'un échantillon. Trois séries de dilutions ont ainsi été préparées pour chaque échantillon. Un volume de 100 µL a été prélevé de chaque dilution et déposé sur une plaque d'agar (Casein-peptone glucose agar, Mikrobiologie BDH). Les plaques ont été incubées à 37°C pendant 30 heures. Le nombre de colonies a ensuite été compté et les résultats rapportés sous la forme d'unité de formation de colonies en fonction du facteur de dilution.

### **Poids sec**

Le poids sec des échantillons d'alginate polymérisé a été déterminé en plaçant les échantillons en entier au four à 105 °C pendant environ 16 heures. Les échantillons de contrôle ont aussi été soumis au même traitement de séchage. Une fois sec, les échantillons ont été pesés sur une balance analytique (AL204, Mettler Toledo, Chine).

### **Chromatographie en phase gazeuse**

Cette méthode a été utilisée afin de déterminer la concentration de PCE et ses produits de transformation dans les bouteilles. Un échantillon de 300 µl était prélevé dans l'espace de tête d'une bouteille à l'aide d'une seringue à gaz étanche et injecté dans un appareil à chromatographie en phase gazeuse Agilent Technologies 6890 GC (Wilmington, É-U) équipé d'un détecteur « Flame Ionization Detector » et d'une colonne de 3 mm x 3,66 m Carbowax B enduite de 1% SP-1000 (Supelco, Bellefonte, É-U). Le gaz utilisé pour la phase mobile était de l'hélium et l'appareil était programmé pour des cycles de 1,25 minutes à 50°C suivie d'un

échauffement de 60 °C par minute jusqu'à 220 °C maintenu pendant 6 minutes. Les courbes étalons ont été faites avec des mélanges gazeux obtenus de Liquid carbonic, Praxair et Scott gas. La quantité de chaque éthène d'intérêt (incluant PCE, TCE, DCE, VC, éthène et l'alkane éthane) dans l'échantillon gazeux était rapportée et leur concentration finale dans la bouteille était calculée en tenant compte du volume de l'espace de tête, le volume de la phase liquide et la constante de Henry.

## 4. Résultats

### 4.1. Cultures KB1

#### 4.1.1. Premières cultures

Au début du projet, nous avons peu de renseignements sur la façon d'entretenir la croissance du consortium enrichi en *D. ethenogenes*, la culture KB1, y compris les concentrations cellulaires optimales pour la déhalogénéation du PCE. Les profils de déhalogénéation du PCE lors des premiers transferts ont donc servis de point de départ pour mieux comprendre les besoins et les particularités de la culture. Ces profils ont montrés une activité de déhalogénéation du PCE significative mais une faible production d'éthène.

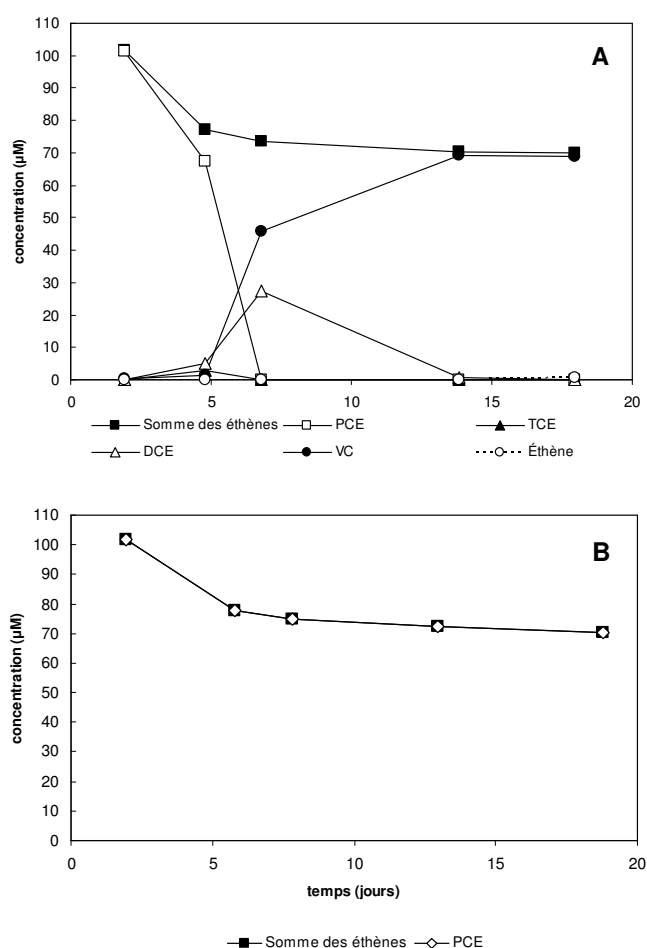


Fig. 12. (A) Profil de déhalogénéation du PCE par l'une des premières cultures de KB1 et (B) profil de déhalogénéation du PCE dans les bouteilles contrôle avec milieu de culture stérile.

Les résultats obtenus suggèrent que la culture a déhalogéné le PCE et son premier produit, le TCE, complètement pendant les 7 premiers jours. Cependant, les éthènes portant deux et un atome de chlore se sont accumulés dans la bouteille. Environ 18 jours après l'inoculation, 99% des molécules de départ ne portaient plus qu'un seul atome de chlore et 1% seulement du PCE de départ a été complètement converti en éthène. La baisse de la somme des éthènes (PCE et ses produits de transformation) a été attribuée à une perte à travers le bouchon puisque qu'une baisse similaire a été observée dans les échantillons abiotiques.

#### **4.1.2. Contamination par l'oxygène**

Nous avons déjà mentionné la grande sensibilité des bactéries *D. ethenogenes* à l'oxygène. Un indicateur coloré, la résazurine, présente dans le milieu de culture a d'ailleurs été utilisée afin de déceler la présence de traces d'oxygène. Lors des manipulations pour inoculer de nouveaux milieux de culture, il est arrivé qu'une très faible coloration rosée (signe de traces d'oxygène) apparaisse et persiste pendant quelques minutes. Ces échantillons étaient immédiatement éliminés. Cependant, lors des premiers essais faits sur les cultures, une pièce d'équipement défectueuse a causé la contamination de plusieurs échantillons. La couleur rosée de l'indicateur coloré a persisté pendant 30 minutes à une heure. Ces échantillons ont tout de même été analysés afin d'observer l'impact de la contamination (concentration inconnue) sur le profil de déhalogénéation du PCE. D'autres expériences plus rigoureuses ont par la suite été réalisées pour observer l'effet de la contamination des cultures par l'oxygène.

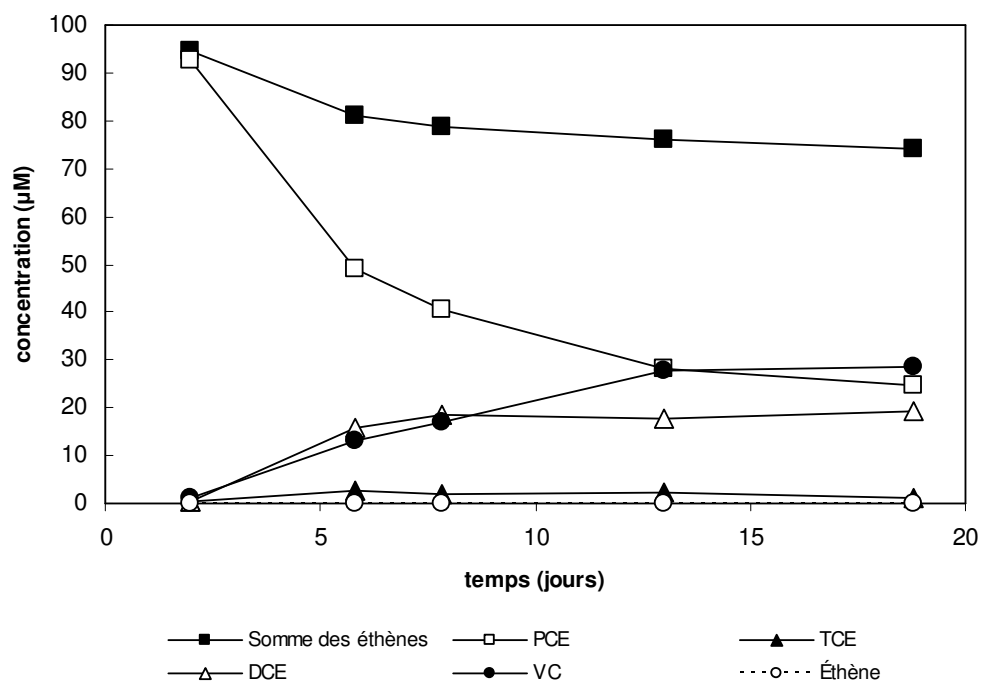


Fig. 13. Profil de déhalogénéation du PCE par l'une des premières cultures de KB1 contaminée par de l'oxygène lors de l'inoculation.

Contrairement à une culture saine, les échantillons contaminés ont montrés une diminution plus lente de la concentration de PCE. De faibles concentrations de TCE persistaient durant toute la durée de l'expérience et les autres intermédiaires étaient aussi présents. L'éthène était pratiquement inexistant. À cette étape du projet, nous avons attribué aux cultures contaminées par l'oxygène les observations suivantes : une activité de déhalogénéation plus lente du PCE, une absence ou des traces d'éthène et une accumulation persistante de VC et DCE.

#### 4.1.3. Stimulation par l'acide lactique

Dans la culture enrichie, l'acide lactique présent dans le milieu a été utilisé par certaines bactéries pour produire de l'hydrogène qui était à son tour utilisé par les cellules de *D. ethenogenes* pour la déhalogénéation des éthènes chlorés (déhalorespiration). Nous avons tenté de stimuler la déhalogénéation des éthènes chlorés en ajoutant après quelques jours une nouvelle

dose d'acide lactique correspondant à la concentration présente au départ : 5 mM. L'expérience a été réalisée en duplicata et l'indice de la biomasse présente dans les échantillons (figure 14) était représenté par la concentration de protéines dans le milieu. Les cultures stimulées ont été comparées à des cultures contrôles (figure 15) qui contenaient seulement la dose initiale d'acide lactique présent dans le milieu de culture lors de l'inoculation et auxquelles nous avons ajouté un volume équivalent de solution saline (0,9% NaCl).

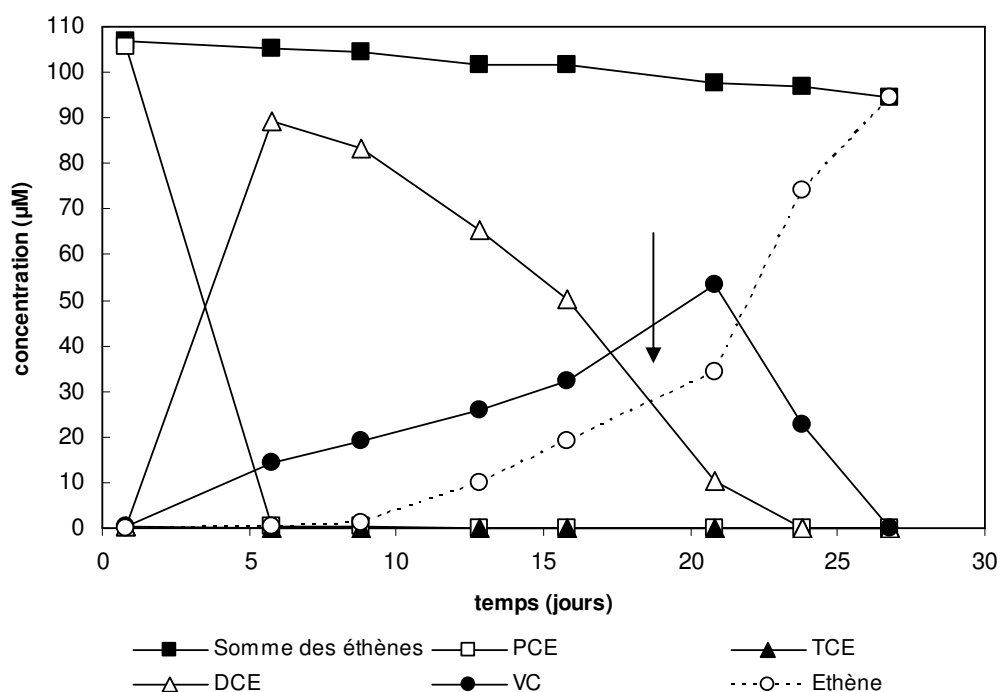


Fig. 14. Profil de déhalogénéation du PCE par la culture KB1 ayant reçue une dose d'acide lactique correspondant à 5 mM au jour 18 après l'inoculation. La concentration de protéines au départ est de 18,1 mg/L et les valeurs sont les moyennes de duplicatas; l'écart est au maximum de 10%.



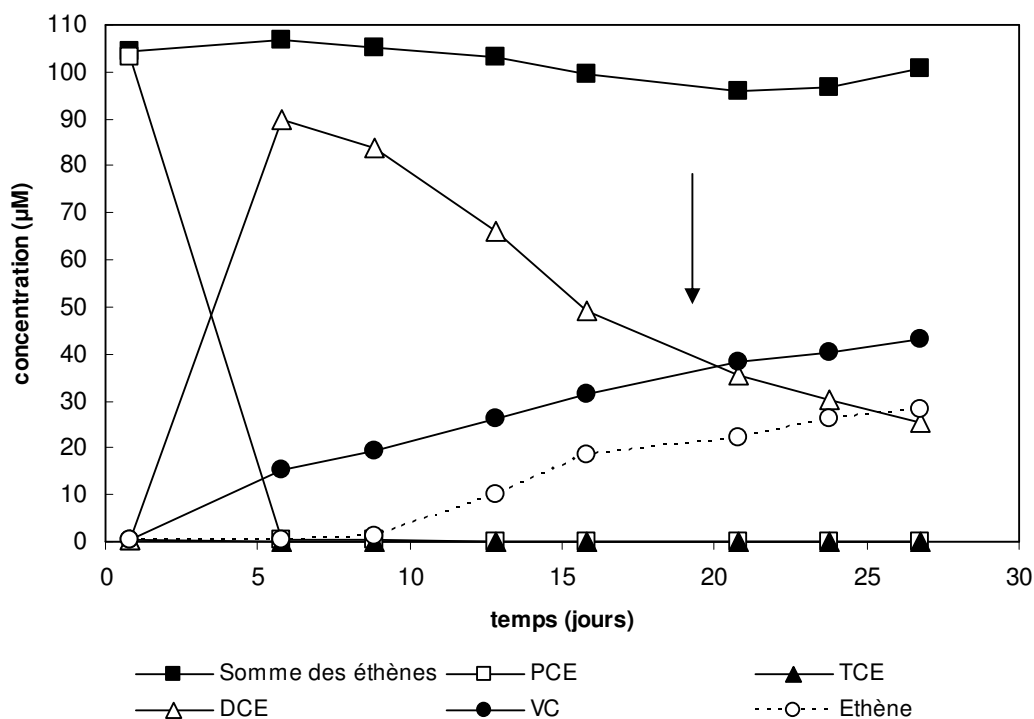


Fig. 15. Profil de déhalogénéation du PCE par la culture KB1 ayant reçue une solution saline au jour 18 après l'inoculation. La concentration de protéines au départ est de 18,1 mg/L et les valeurs sont les moyennes de duplicatas ; l'écart est au maximum de 10% pendant les 15 premiers jours et au maximum de 15% jusqu'à 27 jours.

Nous avons pu constater que les échantillons ayant reçus une dose supplémentaire d'acide lactique pouvaient réaliser la conversion complète du PCE vers l'éthène. Dans les échantillons contrôle, la conversion du produit majoritaire, le DCE, a continué au-delà de 18 jours mais est restée lente avec une vitesse moyenne de 1,7  $\mu\text{M}$  par jour entre le 20<sup>e</sup> et le 26<sup>e</sup> jour. Durant le même intervalle de temps, la production d'éthène a atteint la vitesse moyenne de 1,0  $\mu\text{M}$  par jour pour les échantillons non stimulés (figure 15) alors qu'elle était dix fois plus grande (10,0  $\mu\text{M}$  par jour) dans les échantillons stimulés (figure 14).

À la fin de l'expérience, les pourcentages des trois produits de déhalogénéation majoritaires (DCE, VC et éthène) ont été calculés par rapport à la somme totale du PCE et de ses produits de transformation dans les échantillons stimulés (acide lactique) et les échantillons non-stimulés (solution saline). La figure suivante (figure 16) nous a permis de comparer directement

le résultat des produits majoritaires de la déhalogénéation du PCE mesurés 27 jours après le début de l'expérience (donc 9 jours après l'ajout de la dose additionnelle d'acide lactique) dans les échantillons stimulés et les échantillons contrôle. La stimulation a eu pour résultat de permettre aux cultures de convertir complètement les intermédiaires DCE (de 24% à 0%) et VC (de 42% à 1%). Enfin, cette déhalogénéation des intermédiaires chlorés a fait en sorte que l'éthène dans les échantillons stimulés représentait environ 99% des éthènes d'intérêts alors qu'il était de moins de 30% dans les échantillons contrôles.

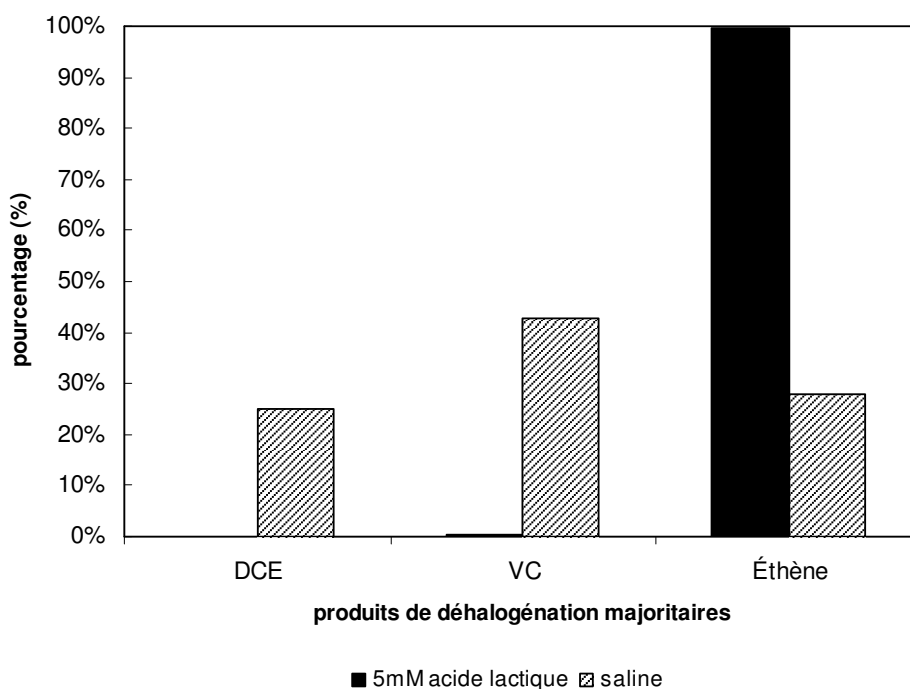


Fig. 16. Comparaison du pourcentage des concentrations finales de 1,2-DCE, VC et éthène par rapport à la concentration totale du PCE et de ses produits de déhalogénéation dans les échantillons pour des cultures stimulées et non-stimulées par l'ajout d'acide lactique (5 mM).

Cette forte stimulation par l'acide lactique nous a permis de réaliser une autre expérience où des doses additionnelles de 50  $\mu$ M de PCE et de 5 mM d'acide lactique ont été ajoutées au 15<sup>e</sup> jour de l'expérience. Comme le montre la figure 17, la dose additionnelle de PCE a été totalement convertie en éthène. La concentration initiale de protéines que nous avons utilisé

comme indicateur de la quantité de cellules présentes dans la culture est de 17 mg /L. Cependant, au moment où l'acide lactique et le PCE sont ajoutés, la culture contenait 65 mg/L de protéines.

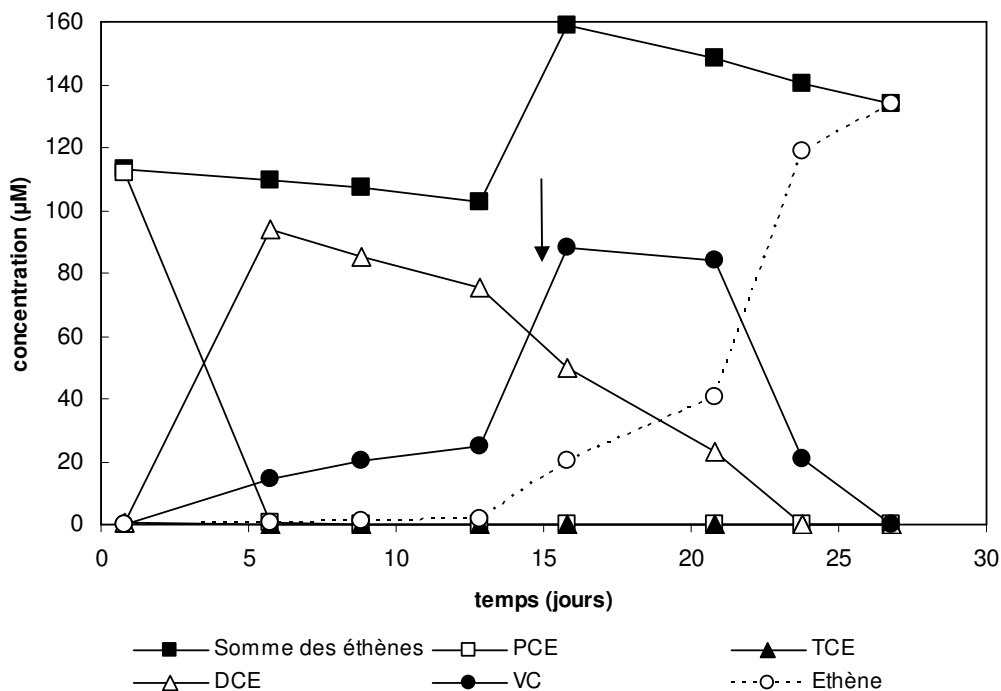


Fig. 17. Profil de déhalogénéation du PCE par la culture KB1 ayant reçue des doses additionnelles de 5 mM d'acide lactique et de 50 µM de PCE au jour 15 après l'inoculation. La concentration de protéines au départ est de 17 mg/L et les valeurs sont les moyennes de duplicatas ; l'écart est au maximum de 15%.

En observant le profil de déhalogénéation à la figure 17, nous n'avons pu observer aucune augmentation significative du PCE ou TCE vers la 15<sup>e</sup> journée. Ce moment correspondait à l'addition des doses d'acide lactique et de PCE : la somme des éthènes d'intérêt est passée de 105 µM à 155 µM. Cependant, la concentration du VC a augmenté de 23 µM à 89 µM. Le PCE ajouté aurait donc été transformé en VC. L'acide lactique était aussi une source de carbone pour cette culture et servait à augmenter le nombre de cellules actives dans les échantillons. Il est donc possible que la stimulation observée soit attribuable au fait que la culture contenait davantage de cellules au 15<sup>e</sup> jour qu'au premier jour (65 mg/L protéines au 15<sup>e</sup> jour vs. 17 mg/L protéines au premier jour) et non seulement à l'injection de donneurs d'électrons additionnels.

#### 4.1.4. Effet de l'accroissement de la quantité de microorganismes

Comme l'une des raisons pouvant expliquer une partie de la stimulation par l'acide lactique était l'augmentation de la biomasse (ou quantité de microorganismes) dans les échantillons, nous avons réalisé des expériences visant à déterminer l'augmentation de la concentration de protéines en fonction du temps dans des cultures qui reçoivent des doses ponctuelles d'acide lactique. La figure 18 montre que dès l'inoculation d'un milieu de culture frais contenant 5 mM d'acide lactique, la quantité de protéines a augmenté rapidement durant les 5 premiers jours puis est restée relativement stable jusqu'à l'addition d'une dose supplémentaire d'acide lactique. À partir de 12,7 jours, nous avons observé un phénomène similaire puisque la quantité de protéines a augmenté une nouvelle fois et est restée stable jusqu'à l'addition de la troisième dose d'acide lactique.

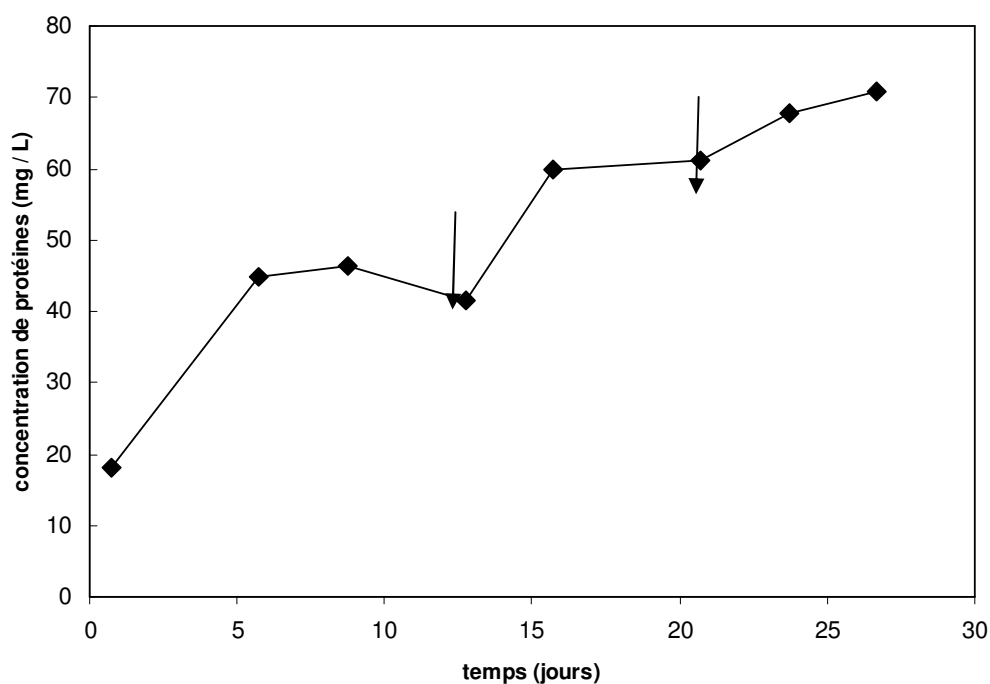


Fig. 18. Augmentation de la quantité de protéines dans des cultures ayant reçues des doses supplémentaires de 5mM d'acide lactique. Les cultures débutent avec une dose initiale et les ajouts sont faits aux jours 12,7 et 20,7.

Par la suite, nous avons réalisé plusieurs expériences indépendantes en utilisant des quantités initiales de microorganismes différentes afin de pouvoir déterminer l'effet de la biomasse initiale sur le profil de déhalogénéation du PCE. Comme dans les expériences précédentes, la concentration de protéines dans chaque échantillon a été utilisée comme indicateur de la biomasse présente. Les concentrations initiales de protéines testées étaient de 11,3 mg/l (figure 19), 55,0 mg/L (figure 20), 63,6 mg/L (figure 21) et 85,0 mg/L (figure 22).

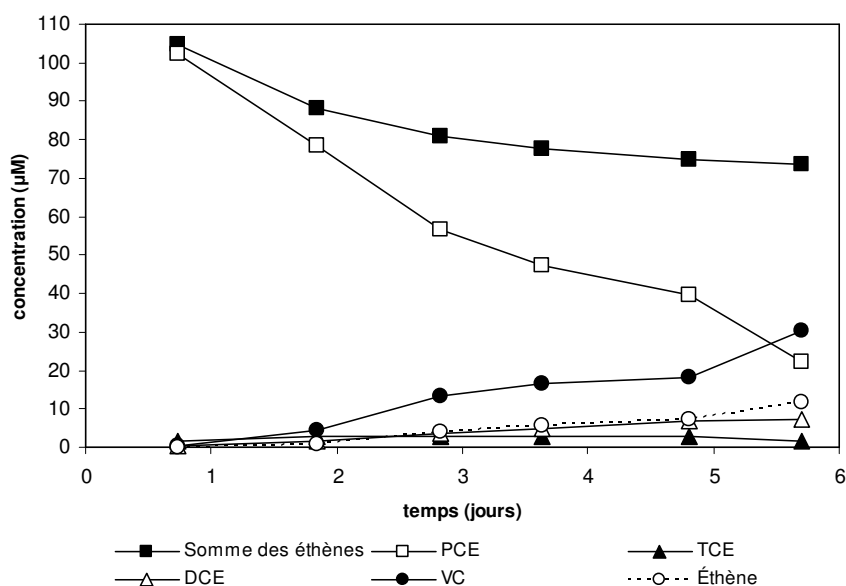


Fig. 19. Profil de déhalogénéation du PCE par la culture KB1. La concentration de protéines au départ est de 11,3 mg/L et les valeurs sont les moyennes de duplicatas ; l'écart est au maximum de 15%.

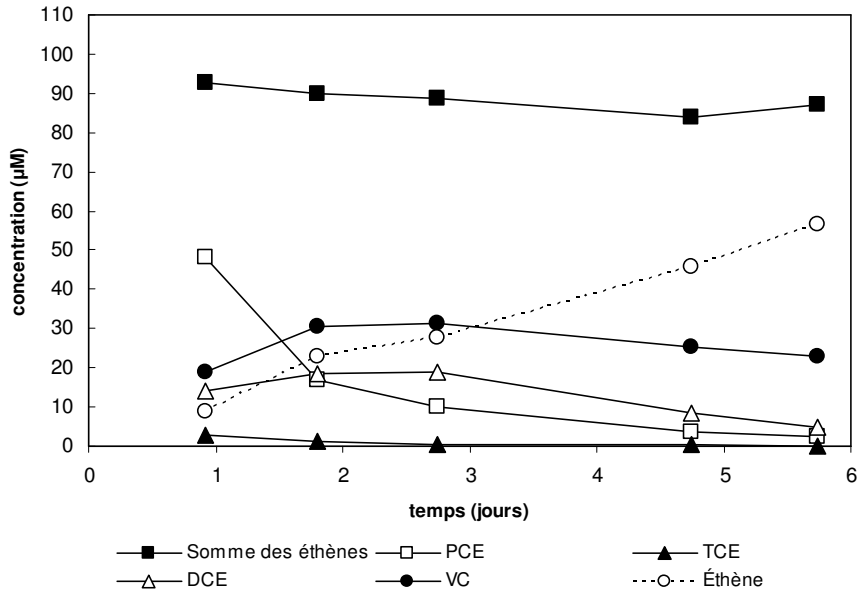


Fig. 20. Profil de déhalogénéation du PCE par la culture KB1. La concentration de protéines au départ est de 55,0 mg/L et les valeurs sont les moyennes de duplicatas ; l'écart est au maximum de 15%.

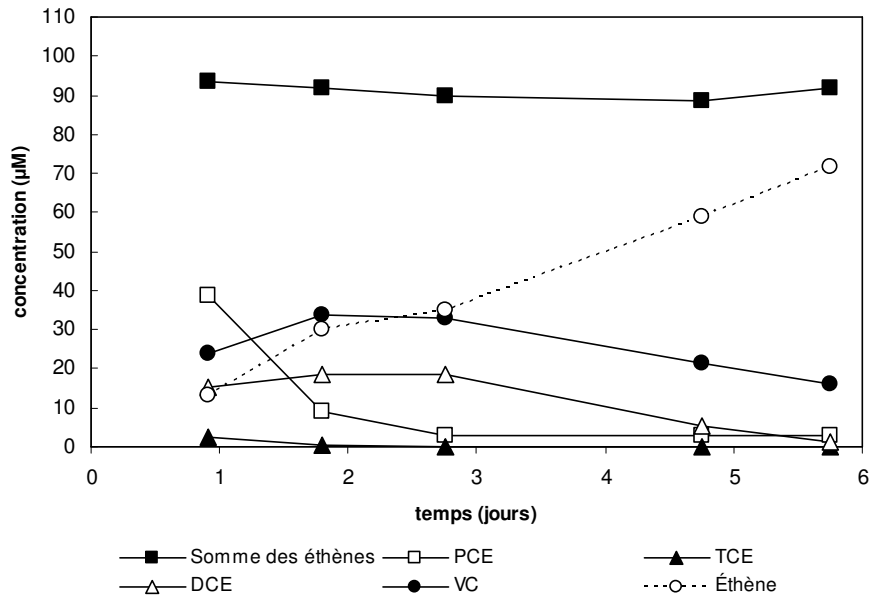


Fig. 21. Profil de déhalogénéation du PCE par la culture KB1. La concentration de protéines au départ est de 63,6 mg/L et les valeurs sont les moyennes de duplicatas ; l'écart est au maximum de 15%.

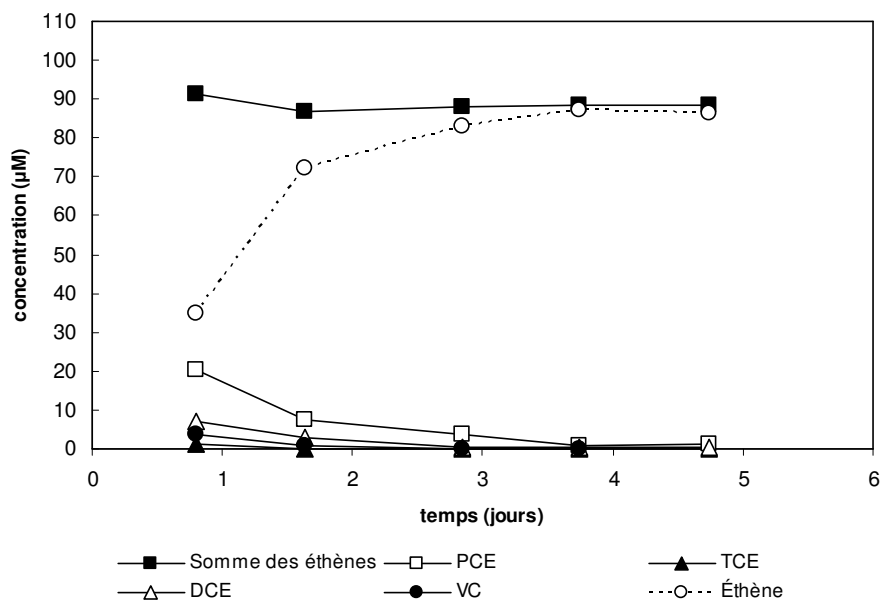


Fig. 22. Profil de déhalogénéation du PCE par la culture KB1. La concentration de protéines au départ est de 85,0 mg/L et les valeurs sont les moyennes de duplicatas ; l'écart est au maximum de 15%.

Afin de pouvoir comparer les différents profils de déhalogénéation, nous avons utilisé les valeurs de concentration du PCE et des autres éthènes majoritaires mesurés à 2,8 jours. Ce temps a été choisi puisqu'il correspondait aux dernières mesures faites sur les échantillons contenant une biomasse initiale de 85,0 mg/L en protéines avant que la conversion du PCE en éthène dans ces échantillons ne soit terminée. Nous avons calculé pour chaque type d'éthène d'intérêt le pourcentage qu'il occupait sur la concentration totale des éthènes d'intérêts (PCE, TCE, DCE, VC, Eth).

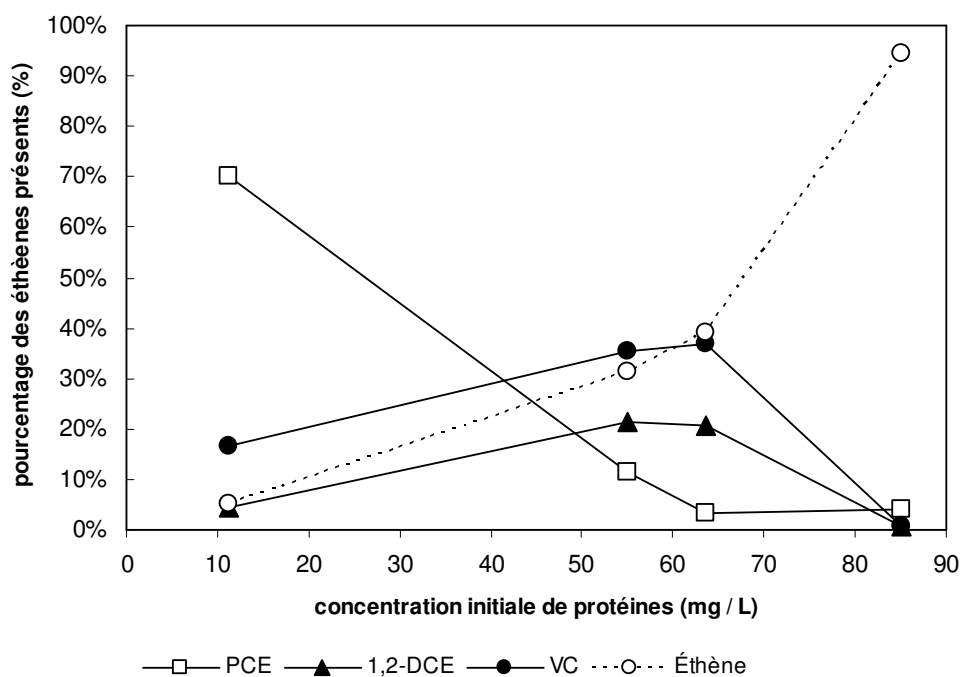


Fig. 23. Variation du pourcentage de PCE, 1,2-DCE, VC et éthène présents à 2,8 jours en fonction de la concentration initiale de protéines dans les échantillons de la culture KB1.

Nous avons pu observer à la figure 23 que tant que la concentration de PCE se situait au-delà de 5% à 10%, l'augmentation de la concentration des produits majoritaires de la déhalogénéation (1,2-DCE, VC, éthène) variait de façon directement proportionnelle avec l'augmentation de la biomasse initiale. La diminution de la concentration de PCE a aussi été linéaire jusqu'à ce qu'elle représente environ 5% des éthènes. Lorsque la biomasse initiale permettait d'atteindre ce seuil, les concentrations de 1,2-DCE et VC diminuaient rapidement. Le plus haut pourcentage d'éthène observé fut 93% avec une biomasse initiale de 85 mg/L.



#### 4.1.5. Résumé des résultats et conclusion sur la culture KB1

Les premières cultures du consortium enrichi en *D. ethenogenes* nous ont permis de connaître le profil général de déhalogénéation du PCE et ont servis de point de repère dans l'exploration de l'importance des paramètres comme la biomasse initiale ou l'ajout d'acide lactique. La première observation qui a été faite est le déclin de la somme des éthènes d'intérêts tout au long des expériences. Le fait que ce déclin était similaire à celui observé dans les bouteilles contrôle (abiotique) et qu'aucun produit de déhalogénéation ne fut détecté dans ces dernières suggère qu'une partie des éthènes a été absorbée par les bouchons. Suite à cette observation, des mesures ont été prises afin de limiter cette absorption (couche de Téflon).

Le profil généré par les premiers résultats montre que les cultures étaient capables de déhalogéner le PCE mais que la conversion finale vers l'éthène a été faible. En effet, à la figure 12, nous avons pu observer une disparition rapide du PCE pendant les 7 premiers jours et le résultat de cette conversion fut une accumulation de TCE, 1,2-DCE et VC. Cependant, lorsque le PCE, TCE et DCE ont disparu, la conversion finale du VC en éthène fut beaucoup plus lente comparativement aux travaux réalisés par une autre équipe (51). Les expériences sur les premières cultures ont aussi produit des échantillons contaminés par l'oxygène et la plupart de ces échantillons contaminés nous ont fournis des occasions d'observer l'effet de la contamination de l'oxygène sur le profil de déhalogénéation du PCE. Comme le consortium KB1 était enrichi en *D. ethenogenes* et que cette bactérie était responsable de la majorité de la déhalogénéation complète du PCE, nous nous attendions à observer une baisse globale de l'activité. Les profils (figure 13) ont montré une faible transformation de PCE si bien qu'il faisait parti des éthènes chlorés majoritaires après plus de 18 jours alors qu'il était éliminé en 7 jours dans les échantillons non contaminés. Malheureusement, il ne nous était pas possible à cette étape de déterminer la quantité d'oxygène entré dans les échantillons et des expériences plus détaillées devaient être réalisées à une autre étape du projet.

En prenant compte des résultats sur les profils de déhalogénéation (figure 12) des premières cultures, nous avons envisagés deux hypothèses pouvant expliquer le fait que la

transformation se soit arrêtée au VC. Premièrement, il était possible que les premières cultures aient été contaminées par de l'oxygène suite à une erreur lors de l'inoculation initiale. Cependant, nous avons aussi observé le profil de déhalogénéation de cultures contaminées et dans ces cas, la transformation s'arrêtait bien avant que le VC soit le seul produit majoritaire. Cette hypothèse semblait donc peu valide. Deuxièmement, nous savions que les bactéries *D. ethenogenes* enlèvent les atomes de chlore des éthènes chlorés par déhalorespiration, une réaction qui, pour les cellules de *D. ethenogenes* nécessite de l'hydrogène moléculaire comme donneur d'électron et les éthènes chlorés comme accepteurs d'électrons. Si la conversion s'arrêtait au VC, c'était peut-être parce que la culture avait consommée la dose initiale d'acide lactique et qu'elle ne disposait plus d'une source capable de lui procurer de l'hydrogène moléculaire. Afin de vérifier cette hypothèse et en ayant comme objectif d'observer une conversion complète du PCE et éthène, nous avons réalisé une expérience où une dose supplémentaire d'acide lactique était ajoutée plusieurs jours après l'inoculation. Les figures 14 et 15 montrent les profils de déhalogénéation du PCE obtenus suite à cette expérience. La comparaison des deux profils générés a démontré que l'ajout d'acide lactique stimulait la déhalogénéation des éthènes chlorés et permettait une conversion complète vers l'éthène. Les échantillons qui ont reçus de l'eau saline ont vu leur vitesse apparente de disparition du 1,2-DCE diminuer à partir du 16<sup>e</sup> jour jusqu'à la fin de l'expérience. Les trois produits majoritaires que nous avons pu retrouver dans ces échantillons à la fin de l'expérience sont le 1,2-DCE (25%) le VC (47%) et l'éthène (28%) alors que dans les échantillons stimulés, l'éthène représentait plus de 99% des produits. Nous pensons donc que c'est l'ajout d'acide lactique qui a permis aux cellules de compléter la déhalogénéation des éthènes chlorés. Le deuxième effet observé suite à l'ajout d'acide lactique a été fait suite à la réalisation d'une expérience similaire à la première sauf qu'une dose supplémentaire de PCE (50  $\mu$ M) a été ajoutée en même temps que l'acide lactique (figure 17). Environ 24 heures après l'injection de cette dose supplémentaire de PCE, non seulement nous n'avons détecté aucune trace de PCE dans les échantillons mais les cultures avaient aussi converti la majorité de cette dose supplémentaire en VC. En effet, la concentration totale des éthènes d'intérêt (somme des produits) durant cet intervalle de 24 heures était passée de 102 à 158  $\mu$ M et la concentration du VC de 25 à 88  $\mu$ M. C'est lors des expériences suivantes que nous avons trouvé une explication à cette surprenante efficacité dans la vitesse de déhalogénéation du PCE au VC. Ces expériences avaient comme objectif de déterminer l'effet de

l'ajout supplémentaire d'acide lactique sur la biomasse contenue dans les bouteilles. La mesure de la biomasse a été faite en mesurant la concentration de protéines dans les échantillons. Comme le montre la figure 18, la concentration des protéines a augmenté à partir du premier jour puis s'est stabilisée quelques jours suivants. Cette augmentation suivie d'une stabilisation s'est répétée de nouveau lors des ajouts subséquents d'acide lactique mais l'augmentation était toujours plus faible chaque fois. Ces variations de concentration de protéines suggèrent que l'acide lactique a aussi stimulé l'augmentation de la biomasse. Ainsi, lors de l'injection de la dose supplémentaire de PCE, la biomasse contenue dans la culture de départ avait augmentée et les résultats obtenus seraient attribuables à la fois à cette augmentation de la biomasse et à l'acide lactique. L'ajout d'acide lactique représenterait donc une façon de stimuler la conversion complète du PCE en éthène en introduisant dans les échantillons une nouvelle source de donneur d'électrons. Cette stimulation entraînerait également (en quelques jours) une augmentation de la quantité de biomasse, mesurée par la concentration de protéines dans les échantillons.

Un autre facteur influençant les profils de déhalogénéation du PCE serait donc la biomasse initiale présente dans les échantillons. En effet, la concentration de protéines utilisée comme indice de la biomasse a influencé non seulement la vitesse mais aussi le pourcentage de molécules de PCE qui ont été complètement converties en éthène avant que la dose initiale d'acide lactique soit consommée. En comparant les profils de déhalogénéation aux figures 19, 20, 21 et 22, nous avons pu déterminer que la vitesse apparente de disparition du PCE et d'apparition de l'éthène augmentait en fonction de la biomasse initiale. Nous avons également observé un effet sur la concentration des intermédiaires. Par exemple le VC a atteint des concentrations supérieures au PCE lorsque la concentration de ce dernier était d'environ 20  $\mu\text{M}$  et sauf lorsque la biomasse initiale dans les échantillons était de 85 mg/L de protéines. Aussi, l'activité de déhalogénéation des éthènes chlorés lorsque la biomasse était de 11,3 mg/L de protéines a été comparable aux résultats obtenus avec les premières cultures c'est-à-dire que la vitesse de la déhalogénéation s'estompait rapidement et s'arrêtait avant la conversion totale des éthènes chlorés en éthène. Nous avons proposé dans la section précédente que cet arrêt serait principalement dû à un manque de donneurs d'électrons. Par contre, le fait d'avoir une biomasse élevée dans un milieu contenant la même dose initiale d'acide lactique permettrait une déhalogénéation complète du PCE en éthène.

## **4.2. Développement et optimisation de l'encapsulation**

### **4.2.1. Choix des polymères**

Après une revue de la littérature afin de trouver les polymères déjà utilisés pour l'encapsulation de cellules vivantes, nous en avons retenus deux qui seraient testés lors du développement de la méthode d'encapsulation. Le choix des polymères s'est fait en tenant compte de quatre critères différents : biodégradabilité, disponibilité, coût de l'encapsulation, conditions de l'encapsulation sans impact négatif sur l'activité des cellules. Les polymères naturels alginate et chitosane ont été retenus principalement parce qu'ils sont biodégradables, ils sont disponibles en grande quantité et leur coût ainsi que le coût de leurs agents gélifiants sont faibles. Par la suite, nous avons identifié les conditions nécessaires à la formation de billes gélifiées faites à partir de ces polymères. La technique de « drop-wise » a été retenue pour cette étape. Il s'agit d'une technique d'utilisation relativement rapide comparée aux autres utilisées pour ce projet et son utilisation nous permet de tester des échantillons ayant des propriétés très variées. En comparaison, l'équipement utilisé pour la microencapsulation avec ultrasons nécessitait des mélanges de polymères ayant une faible viscosité (<100 cps dans une solution de 1% m/v) ainsi qu'un nettoyage et conditionnement complet de l'équipement entre chaque échantillon. Les résultats des différents tests présentés aux tableaux 1, 2 et 3 montrent la démarche progressive d'identification d'une combinaison polymère-agent gélifiant pour les polymères alginate et chitosane. Les différents polymères et agents gélifiants ont été dissous dans de l'eau saline (0,9% NaCl) et les solutions résultantes ont été utilisées pour former des billes de gel. Une combinaison satisfaisante permettait la formation de billes assez résistantes pour être manipulées avec les doigts dans un délai de quelques secondes.

Tableau 1. Échantillons d'alginate et agents gélifiants utilisés lors des tests visant à identifier les conditions nécessaires à la formation de billes gélifiées

Échantillon d'alginate	Agents gélifiants (m/v)	Observations
Protanal LFRS/60 Haute teneur en acide mannuronique	2 % ions $\text{Ca}^{2+}$ sous forme de $\text{CaCl}_2 \bullet 2\text{H}_2\text{O}$	Billes aplaties et de forme irrégulière.
Protanal LF10 / 60 Haute teneur en acide guluronique	2 % ions $\text{Ca}^{2+}$ sous forme de $\text{CaCl}_2 \bullet 2\text{H}_2\text{O}$	Billes sphériques et translucides. Résistantes à la déformation mécanique et reprennent leur forme après déformation.
Protanal LF10/60LS Haute teneur en acide guluronique	2 % ions $\text{Ca}^{2+}$ sous forme de $\text{CaCl}_2 \bullet 2\text{H}_2\text{O}$	Billes sphériques et translucides. Se déforment sous l'action d'une force mécanique et restent aplaties.

Les différentes combinaisons testées nous ont permis de constater que l'alginate ayant une grande proportion d'acide mannuronique (~70%) donnait des billes aplaties et de forme irrégulières. Ce résultat était envisagé puisque la gélification de l'alginate se fait grâce à l'acide guluronique dans la chaîne de polymère (69). Les particules d'alginate aplaties seraient donc le résultat de liens trop peu nombreux pour garder la forme liquide initiale intacte. La différence entre les échantillons Protanal LF10/60 et Protanal LF10/60LS a été *a priori* impossible à faire. Cependant, lorsque manipulées, les billes de Protanal LF10/60LS se sont déformées légèrement et ne sont pas revenues à leur forme sphérique d'origine. Le Protanal LF10/60 a donc été retenu comme candidat pour les expériences avec les différents montages.

Tableau 2. Échantillons de chitosane et agents gélifiants utilisés lors des tests visant à identifier les conditions nécessaires à la formation de billes gélifiées

Échantillons de chitosane	Agents gélifiants (% m/v)	Observations
Kitomer 22cps	10% lignosulfonate, pH 5 10% lignosulfonate pH 7 10% lignosulfonate pH 10 25% lignosulfonate pH 5 25% lignosulfonate pH 7 25% lignosulfonate pH 10 0,4% alginate + 10% lignosulfonate 0,8% alginate + 10% lignosulfonate	Billes sphériques et translucides. La chitosane est polymérisée en surface mais les billes se liquéfient si manipulées ou si le contenant est agité faiblement. Elles gagnent en stabilité après une incubation de 30 min dans l'agent gélifiant.
Kitomer 22 cps	2,5% glutaraldéhyde 5% glutaraldéhyde	Billes sphériques et translucides. La chitosane est polymérisée en surface mais les billes se liquéfient si manipulées ou si le contenant est agité faiblement. Les billes sont fragiles même après 30 minutes d'incubation.
Chitomer #117304	10% lignosulfonate pH 5 10% lignosulfonate pH 7 10% lignosulfonate pH 10 25% lignosulfonate pH 5 25% lignosulfonate pH 7 25% lignosulfonate pH 10 0,4% alginate + 10% lignosulfonate 0,8% alginate + 10% lignosulfonate	Billes sphériques et translucides. La chitosane est polymérisée en surface mais les billes se liquéfient si manipulées ou si le contenant est agité faiblement. Elles gagnent en stabilité après une incubation de 30 min dans l'agent gélifiant.

La difficulté majeure rencontrée avec la chitosane a été de trouver des agents gélifiants capables de produire des billes assez résistantes pour être manipulées. Le lignosulfonate a été testé en premier puisqu'il s'agit d'un polymère peu coûteux et non toxique. Cependant, malgré les nombreuses combinaisons testées, nous n'avons obtenus des billes résistantes qu'après 30 minutes d'incubation dans l'agent gélifiant. Compte tenu du fait que la réaction entre la

chitosane et le lignosulfonate est peu connue en raison de la structure complexe du lignosulfonate, nous avons fait varier le pH de la solution gélifiante en espérant favoriser globalement plusieurs types de réactions chimiques (ex. les réactions chimiques avec des groupes amines). Nous n'avons observé aucune différence significative entre ces conditions de pH sur la résistance des billes. Lors des tests avec l'alginate, nous pouvions manipuler les billes avec les doigts en quelques secondes alors qu'avec la chitosane, le bécher utilisé ne pouvait être transporté ou agité faiblement sans obtenir une détérioration complète des particules. La glutaraldéhyde a aussi été utilisée mais plus de 30 minutes étaient nécessaires pour obtenir des billes résistantes. Ainsi, malgré le fait que la glutaraldéhyde est considérée comme un agent gélifiant qui fonctionne bien pour la chitosane (38), nous ne l'avons pas retenu dans notre projet. Enfin, l'apparente lenteur de la gélification avec des billes de chitosane fabriquées avec la technique du « drop-wise » nous a permis de croire que des billes plus petites seraient gélifiées plus rapidement. C'est pourquoi la chitosane a été retenue pour les tests avec les montages où les capsules produites ont un diamètre à l'échelle des micromètres et pour les tests d'enrobage de billes d'alginate.

Tableau 3. Échantillons d'alginate, agents gélifiants et agents d'enrobage utilisés lors des tests visant à identifier les conditions nécessaires à la formation de billes gélifiées

Échantillon d'alginate	Agents gélifiants (m/v)	Agents d'enrobage (m/v)	Observations
Protanal LF10 / 60 Haute teneur en acide guluronique	2 % ions $\text{Ca}^{2+}$ sous forme de $\text{CaCl}_2 \bullet 2\text{H}_2\text{O}$	2% chitosane + 10% lignosulfonate	Billes sphériques et translucides. Résistantes à la déformation mécanique et reprennent leur forme après déformation.
		1% chitosane + 10% lignosulfonate	

Notre objectif étant de proposer un système d'encapsulation fonctionnel, le fait que l'alginate et les ions calcium ne forment pas de liens covalents (69) représentait un obstacle à la durée de vie des capsules dans des milieux faibles en ions calcium ou en présence d'agents

chélateurs. Nous avons alors tenté un compromis : tirer avantage de la formation rapide des capsules d'alginate et du caractère plus durable de la chitosane en enrobant les capsules d'alginate d'une couche de chitosane. La chitosane serait à son tour gélifiée en présence de lignosulfonate. Les capsules obtenues étaient d'une résistance comparable aux billes d'alginate et nous avons décidé de retenir cette formule lors des tests avec les montages d'encapsulation et lors des tests où des capsules contenant des cellules bactériennes seraient utilisées.

Les tableaux précédents montrent la facilité avec laquelle il a été possible de former des billes d'alginate puisque la solution gélifiante ne nécessite que la présence d'ions calcium. Le tableau 2 montre les diverses tentatives faites pour former des billes de chitosane. Lors de ces essais, nous avons privilégié l'utilisation de l'agent gélifiant lignosulfonate à la glutaraldéhyde qui est considéré comme toxique pour les humains. Les résultats des nombreuses tentatives nous permettent de croire que nous pouvons gélifier la chitosane en surface et donc, qu'il serait intéressant de l'utiliser pour enrober des particules d'alginate. C'est pourquoi nous avons envisagé la formation de capsules d'alginate enrobées avec de la chitosane.

#### **4.2.2. Absorption par l'alginate et la chitosane**

L'alginate et la chitosane ont été les deux polymères utilisés pour la fabrication des capsules et nous avons testé les polymères pour leur capacité à absorber le PCE dans leur matrice. Dans le cas où ces matrices absorberaient le PCE, il faudrait alors compenser une baisse apparente de PCE dans les échantillons de bactéries encapsulées par la capacité d'absorption des polymères présents. Les tests d'absorption avec l'alginate ont été faits avec l'alginate choisi au départ pour les expériences d'encapsulation : Protanal LF10/60. La chitosane utilisée fut la Kitomer 22 cps. Des capsules ont été préparées grâce à la technique du « drop-wise » en utilisant une solution d'alginate à 2% (m/v) dans une solution saline stérile et en utilisant une solution gélifiante de calcium ou une solution de 1.5% chitosane dans 1% d'acide acétique et une solution gélifiante de 25% (m/v) de lignosulfonate à pH 10 préparée dans une solution saline.



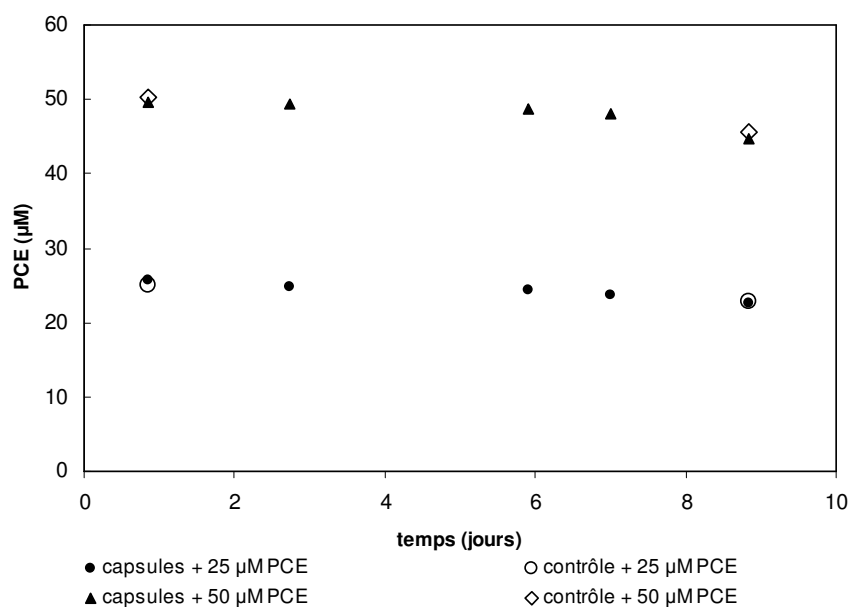


Fig. 24. Concentration de PCE en micromoles par litre dans les échantillons contenant 1,0 g de billes d'alginate. Le temps zéro correspond au moment où le PCE est ajouté aux bouteilles. Les bouteilles contrôles sont préparées de la même façon que les échantillons hormis l'ajout des billes.

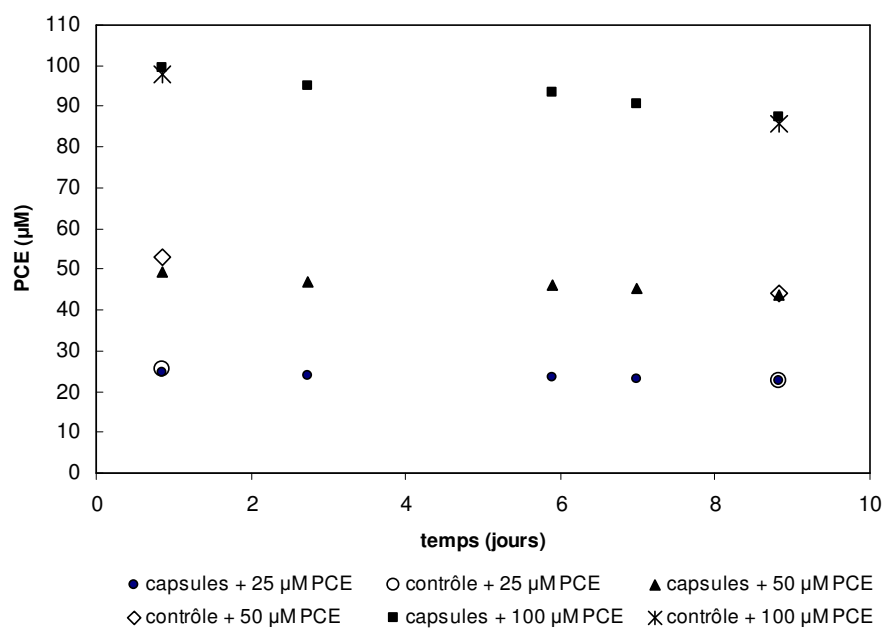


Fig. 25. Concentration de PCE en micromoles par litre dans les échantillons contenant 1,0 g de billes de chitosane. Le temps zéro correspond au moment où le PCE est ajouté aux bouteilles. Les bouteilles contrôles sont préparées de la même façon que les échantillons hormis l'ajout des billes.

Ainsi, pour les quantités de polymère et de PCE testées, nous n'avons pas mesuré de baisse de PCE dans les échantillons qui aurait été attribuable à un phénomène d'absorption par les billes d'alginate (figure 24) et de chitosane (figure 25). En effet, la concentration de PCE au début et à la fin des expériences est la même dans les échantillons avec capsules et sans capsules. Une baisse de la concentration du PCE pendant l'expérience est observée pour quelques échantillons mais serait attribuable à des pertes à travers les bouchons puisque les contrôles abiotiques ont également montré une faible perte de PCE. En effet, la baisse progressive des éthènes présents dans les échantillons est un phénomène qui a aussi été observé dans toutes les expériences de ce projet. Enfin, un bilan de la somme du PCE et de ses produits de déhalogénéation a été fait pour chaque échantillon testé dans ce projet et nous n'avons à aucun moment observé d'absorption d'un ou de plusieurs éthènes d'intérêt lorsque des capsules étaient présentes.

#### **4.2.3. Premier montage : microencapsulation par atomisation avec jet d'air**

##### **4.2.3.1. Paramètres d'encapsulation**

L'encapsulation avec jet d'air est le premier montage qui a été testé. La première étape de son utilisation a été de tester les paramètres de pression d'air dans le bec de l'atomiseur et de débit de la pompe amenant la solution-mère vers l'atomiseur. Ces tests préliminaires ont été fait avec des solutions d'alginate stériles dont la concentration variait entre 1 g/100 ml et 3 g/100 ml. Dès les premiers essais, nous avons réalisé que le débit ne pouvait dépasser 5 ml/min avec la plus faible concentration d'alginate et malgré le fait que l'alginate choisi était de très faible viscosité (20 cps - 70 cps à 1% m/v). Au delà de cette valeur, l'atomiseur en surcharge se remplissait de liquide et éjectait le surplus d'alginate par secousses successives plutôt qu'en un jet continu. Un résultat semblable a été observé pour des valeurs de pression plus faibles que 50 psi. Au-delà de 60 psi, les particules étaient éjectées du bec de l'atomiseur à une grande vitesse. Dans ce cas, un film de polymère se formait à la surface du bain gélifiant. Pour éviter la formation de ce film, il nous était possible d'augmenter la vitesse d'agitation du liquide dans le bain de solution

gélifiante pour éviter que les particules arrivant à la surface de liquide entrent en collision avec des capsules encore liquides. Malheureusement, nous n'avons pas augmenté la vitesse de l'agitation dans ce cas puisqu'elle atteint alors un seuil où il se crée un vortex dans le liquide qui a pour effet de dissoudre les particules avant qu'elles soient gélifiées. Le choix des paramètres reposait donc sur un équilibre entre la pression d'air, le débit et la vitesse d'agitation dans le bain gélifiant. Les tests préliminaires ont montrés que le débit de liquide ne pouvait être ajusté au-delà de 5 ml/min et que la pression d'air devait se situer entre 50 psi et 60 psi.

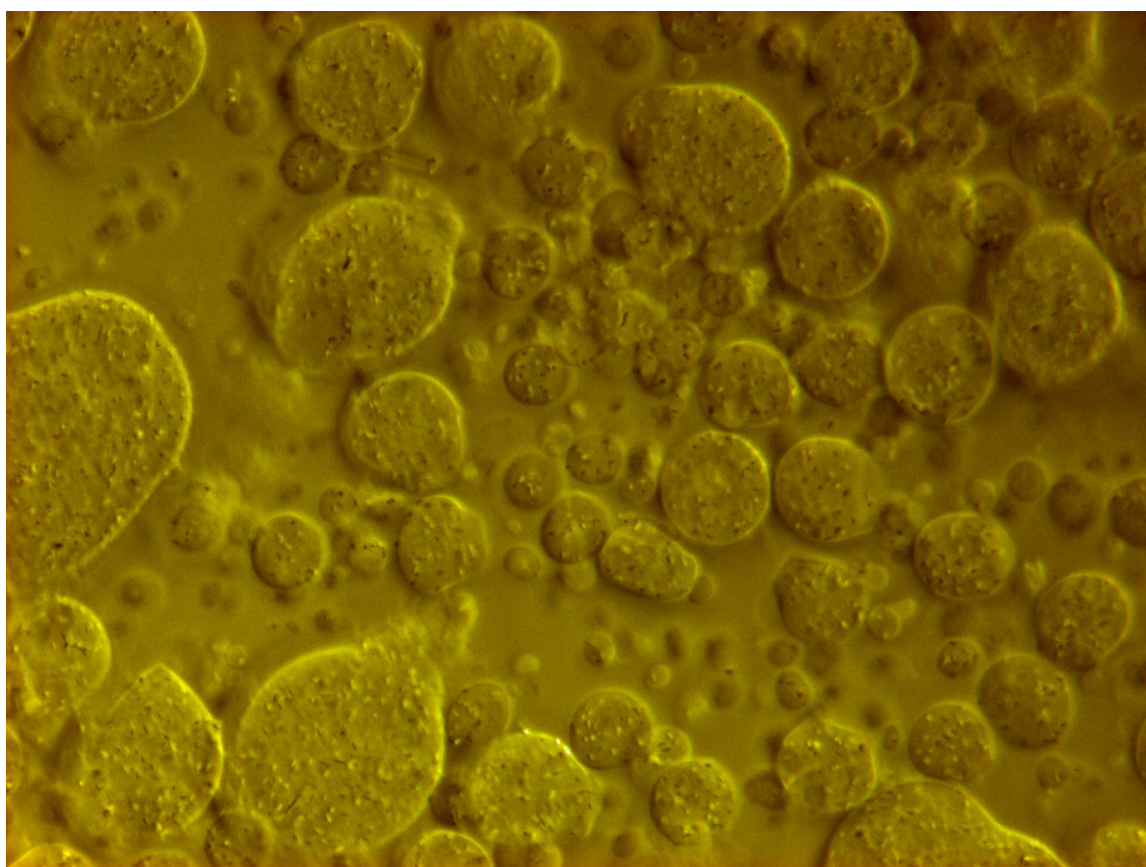


Fig. 26. Microcapsules d'alginate obtenues avec le premier montage. La solution-mère contient 2 % (m/v) d'alginate et 3 g /L de cellules *E.coli* atomisé à 60 psi et un débit de 4,5 ml/min. Observations au microscope optique avec un grossissement de 250x.

#### 4.2.3.2. Efficacité d'encapsulation

Les capsules obtenues grâce à ce montage ont été filtrées une première fois à travers un filtre de mailles d'acier avec des pores de 0,8 mm pour éliminer certains agrégats de gels. En examinant les particules avec un microscope optique, nous avons constaté qu'elles étaient le plus souvent de forme sphérique mais que beaucoup avaient une forme elliptique (figure 26). Aussi, les capsules avaient un diamètre variant entre 5  $\mu\text{m}$  et 400  $\mu\text{m}$ . Dans le but de réduire cette variation de taille, nous avons filtré les capsules une deuxième fois en utilisant un filtre de nylon de 120  $\mu\text{m}$ . Ainsi, nous avons obtenu des échantillons contenant des capsules de la taille recherchée au départ soit un diamètre entre 10 et 100  $\mu\text{m}$ .

Bien que la taille des capsules nous paraissait satisfaisante, seulement une fraction de la solution-mère utilisée au départ se retrouvait dans les échantillons après les étapes de filtration. Nous avons donc déterminé le poids sec de la solution-mère utilisée au départ et comparé la valeur au poids sec des capsules obtenues après les deux étapes de filtration. L'efficacité de l'encapsulation représente le pourcentage de la masse d'alginate obtenue sous forme de capsules de la taille voulue par rapport à la masse totale d'alginate utilisée au départ dans le master mix. Le tableau suivant (tableau 4) regroupe trois expériences d'encapsulation réalisées chacune en triplicata où l'efficacité de l'encapsulation a été la plus grande.

Tableau 4. Efficacité d'encapsulation déterminée par le poids sec des échantillons finaux et de la solution d'alginate de départ pour trois conditions d'encapsulation utilisées avec le premier montage

Paramètres d'encapsulation			Efficacité d'encapsulation (%)
Concentration d'alginate (g/100mL)	Pression d'air	Débit de la pompe (ml / min)	
2	50	4,5	22,8 $\pm$ 7,7
2	60	4,5	23,1 $\pm$ 5,1
3	60	4,5	24,4 $\pm$ 9,0

Ainsi, bien que ce premier système d'encapsulation nous permettait d'obtenir des billes de la taille recherchée, seulement 23% des constituants de la solution-mère se retrouvaient dans le produit final pour les paramètres testés. Un autre montage d'encapsulation a donc été favorisé.

#### **4.2.3.3. Résumé des résultats et conclusion sur le premier montage : microencapsulation par atomisation avec jet d'air**

Durant la première phase des tests avec ce montage, nous avons déterminé les valeurs de pression, débit de liquide et concentration d'alginate dans la solution-mère pour lesquelles une atomisation était possible. Il nous est apparu évident en constatant les valeurs de débit maximal, de concentration d'alginate maximale et de pression minimale que le montage utilisé exigeait des solutions de polymère dont la viscosité ne dépassait pas 210 cps. L'apparition d'un film d'alginate à la surface du bain gélifiant pendant l'atomisation du mélange de polymère peut être expliquée par l'arrivée d'un trop grand nombre de particules à la surface de la solution gélifiante. Les particules ne pourraient alors pénétrer dans le liquide avant que de nouvelles gouttelettes atomisées arrivent à leur tour. Lorsque l'agitation du bain gélifiant fut augmentée pour créer une surface de contact plus grande, nous avons observé la formation de courts filaments d'alginate. Nous pensons que ces filaments étaient le résultat de particules d'alginate entrées en collision puis gélifiées alors qu'elles s'étiraient dû aux forces présentes dans le liquide. L'équilibre entre les différents paramètres d'encapsulation a été atteint avec une valeur de pression de 50 psi ou 60 psi pour des mélanges d'alginate à 2% m/v ou moins et un débit de liquide dans l'atomiseur de 4,5 ml/min.

Le diamètre des capsules obtenues avec le montage par atomisation avec jet d'air se trouvait entre 5  $\mu\text{m}$  et 400  $\mu\text{m}$ . Puisque notre objectif de départ était d'obtenir des microcapsules avec un diamètre entre 10  $\mu\text{m}$  et 100  $\mu\text{m}$ , nous avons filtré les échantillons et rejeté les capsules plus grandes que 120  $\mu\text{m}$ . Cependant, nous avons observé que seule une faible proportion du volume de la solution d'alginate de départ se retrouvait dans les échantillons de billes de la dimension voulue. Afin d'estimer la perte totale de polymère lors de l'utilisation de ce système d'encapsulation, nous avons comparé le poids sec d'un échantillon de billes obtenu à la fin du

procédé au poids sec de la solution d'alginate utilisée pour fabriquer cet échantillon. Nous avons rapporté au tableau 4 trois conditions d'encapsulation avec le premier montage pour lesquelles les valeurs d'efficacité d'encapsulation ont été les plus élevées. En utilisant cet indice d'efficacité d'encapsulation, nous avons été en mesure de juger que malgré la faible viscosité du mélange de polymère et l'optimisation des paramètres d'encapsulation, nous ne pouvions utiliser ce système d'encapsulation sans accepter de perdre environ 67% des constituants du master mix ou de travailler avec des capsules ayant une distribution de taille variant entre 5  $\mu\text{m}$  et 400  $\mu\text{m}$ . C'est donc la faible efficacité du montage qui nous a poussé à envisager un autre système d'encapsulation.

#### **4.2.4. Deuxième montage : microencapsulation par atomisation avec ultrasons**

L'utilisation d'ultrasons pour l'atomisation de mélanges liquides nous a paru *a priori* comme un candidat peu probable pour l'encapsulation de cellules vivantes. En effet, des oscillations ultrasoniques dans un milieu aqueux créent des cavités où la chaleur et la pression détruisent les cellules vivantes. L'utilisation d'ultrasons est même conseillée dans plusieurs applications afin de stériliser des échantillons contenant des microorganismes (11, 66, 68). Cependant, ces systèmes de stérilisation demandent une exposition de plusieurs minutes (2 minutes à 30 minutes) à des ultrasons à haute intensité et sont souvent aidés par des antibiotiques, de la pression (manosonication) ou une forte chaleur. Quand à eux, les appareils utilisés pour l'atomisation de liquide accomplissent leur tâche à des valeurs de puissance relativement faibles (3 watts à 15 watts) et le liquide est exposé aux vibrations pendant un court intervalle de temps puisque le débit de liquide peut atteindre 1,2 ml par seconde. Du côté de la taille des capsules, l'appareil utilisé permet une atomisation où environ 94% des particules ont un diamètre plus petit que 100  $\mu\text{m}$ . C'est à la lumière de ces avantages et inconvénients potentiels que nous avons envisagé d'évaluer la survie de cellules bactériennes au processus d'encapsulation avec le deuxième montage.

#### 4.2.4.1. Survie des cellules

La première étape de l'utilisation du montage a été de savoir si des cellules bactériennes pouvaient survivre au processus d'encapsulation puisque la solution-mère serait soumise à des vibrations ultrasoniques. Pour l'évaluation initiale de la survie, nous avons utilisé des cultures de *E. coli* comme modèle de cellules bactériennes. Une solution-mère contenant environ 100 mg/L de protéines sous forme de cellules bactériennes métaboliquement actives et 2% (m/v) d'alginate a été préparé. La moitié du volume de la solution-mère a été passé à travers le bec de l'atomiseur en fonction à une puissance de 3,5 watts et un débit de 5 ml/min. Les particules ont été récupérées dans un bécher vide et stérile identifié « soniqué ». Le générateur a ensuite été fermé et l'autre moitié de la solution-mère fut passée par le bec de l'atomiseur. La solution a aussi été récupérée dans un bécher stérile et identifié « contrôle ». Ensuite, deux tests ont été fait avec les échantillons soniqués et contrôle en triplicata: détermination de la concentration de protéines et détermination du nombre de cellules viables par CFU.

Avant de procéder à la détermination de la concentration de protéines comme décrit dans la section matériel et méthode, les échantillons ont été lavés pour éliminer les débris cellulaires des cellules qui auraient été détruites par l'atomiseur. Les échantillons contrôle et soniqué ont été dilués dans une solution saline (0,9 % NaCl) puis centrifugés à 3000 g pendant 15 minutes. Le surnageant fut éliminé et le culot resuspendu dans un volume de solution saline identique à celui de l'échantillon au départ.

Tableau 5. Estimation de la survie des cellules de *E. coli* au processus d'encapsulation par vibrations ultrasoniques.

Condition	Soniqué	Contrôle
Concentration de protéines (mg / L)	61,0 ± 5,8	86,7 ± 10,3
Cellules viables (CFU / ml)	(2,83 ± 0,62) • 10 <sup>9</sup>	(3,04 ± 0,34) • 10 <sup>9</sup>

Les concentrations de protéines mesurées semblent supporter l'hypothèse que la survie des cellules a été affectée par les vibrations ultrasoniques puisque les échantillons soniqués accusent la perte de 30% de la quantité de protéines par rapport aux échantillons contrôle. Pour le décompte de cellules viables, les résultats obtenus pour les échantillons soniqués et contrôles sont semblables si l'on tient compte de l'incertitude

#### 4.2.4.2. Tests des polymères alginate et chitosane

Différents échantillons de polymères alginate et chitosane ont été utilisés avec le deuxième montage pour tester la formation des billes avec plusieurs agents gélifiants. Les tableaux 6 et 7 montrent les résultats obtenus avec l'alginate et la chitosane respectivement. Nous avons aussi développé un protocole pour former des billes d'alginate enrobées de chitosane avec ce deuxième montage et les résultats sont regroupés au tableau 8.

Tableau 6. Échantillons d'alginate et agents gélifiants utilisés lors des tests visant à identifier les conditions nécessaires à la formation de billes gélifiées avec le deuxième montage

Polymère	Agent gélifiant (m/v)	Observations
Protanal LF10 / 60	2 % $\text{Ca}^{++}$ sous forme de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Les capsules obtenues sont régulières et les déchets dans le premier filtre sont quasi-inexistants. Sous le microscope, les capsules ont un diamètre variant entre 30 $\mu\text{m}$ et 160 $\mu\text{m}$ avant la deuxième filtration
Protanal LF10 / 60	2 % $\text{Ca}^{++}$ sous forme de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 0.4% chitosane 2 % $\text{Ca}^{++}$ sous forme de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 0.8% chitosane	Formation abondante de fibres.



Le tableau 6 montre qu'il est possible avec ce montage de former des capsules à partir d'une solution d'alginate en utilisant une solution contenant des ions calcium comme agent gélifiant. Nous avons également voulu observer l'effet de la chitosane dans le bain gélifiant sur la réaction de gélification de l'alginate: notre but était de former des capsules d'alginate enrobées de chitosane en une seule étape. Cependant, la présence de chitosane semblait interférer avec la gélification des particules d'alginate et le polymère se répandait dans le bain (présence de fibres) plutôt que de garder la forme d'une bille.

Tableau 7. Échantillons de chitosane et agents gélifiants utilisés lors des tests visant à identifier les conditions nécessaires à la formation de billes gélifiées avec le deuxième montage

Polymère	Agent gélifiant (m/v)	Observations
Kitomer 22cps	10% lignosulfonate pH 5 10% lignosulfonate pH 8 10% lignosulfonate pH 10 25% lignosulfonate pH 5 25% lignosulfonate pH 8 25% lignosulfonate pH 10	Polymère trop visqueux pour l'appareil. Une plus grande puissance est nécessaire pour atomiser le liquide. Les particules ont tendance à s'accumuler à la surface de la solution gélifiante. Si l'agitation du bain est augmentée, de fines fibres de chitosane d'environ 5 mm apparaissent dans le liquide. Les fibres sont très abondantes et la plupart du polymère reste dans les filtres.
Kitomer 14cps (faible viscosité)	5% lignosulfonate pH 8 5% lignosulfonate pH 10 10% lignosulfonate pH 8 10% lignosulfonate pH 10	Les particules ont tendance à s'accumuler à la surface de la solution gélifiante. Si l'agitation du bain est augmentée, de fines fibres

	25% lignosulfonate pH 8 25% lignosulfonate pH 10	de chitosane d'environ 5 mm apparaissent dans le liquide. Les fibres sont très abondantes et la plupart du polymère reste dans les filtres.
Kitomer 14cps (faible viscosité)	2% glutaraldéhyde pH 9 2,5% glutaraldéhyde pH 9 10% glutaraldéhyde pH 6 10% glutaraldéhyde pH9	Les particules ont tendance à s'accumuler à la surface de la solution gélifiante. Si l'agitation du bain est augmentée, de fines fibres de chitosane d'environ 5 mm apparaissent dans le liquide. Les fibres sont très abondantes et la plupart du polymère reste dans les filtres.
Kitomer 14cps (faible viscosité)	10% glutaraldéhyde pH9 + 0,4% alginate	Moins de fibres mais la grande majorité du polymère se retrouve dans les filtres.
Kitomer 14cps (faible viscosité)	10% glutaraldéhyde pH10 + 0,4% alginate	Moins de fibres mais la grande majorité du polymère se retrouve dans les filtres.
Kitomer 14cps (faible viscosité)	10% glutaraldéhyde pH10 + 0,8% alginate	Moins de fibres mais la grande majorité du polymère se retrouve dans les filtres.

Les observations présentées au tableau précédent (tableau 7) sont semblables aux observations réalisées à la section 4.2.1 (tableau 2) de ce travail puisque malgré la diversité des conditions testées, nous n'avons pu obtenir de billes de chitosane résistantes. Lors de ces derniers tests cependant, les particules de chitosane ne gardaient pas leur forme sphérique une fois dans le bain gélifiant et s'étiraient puis se répandaient pour donner de courts filaments. Malgré le fait que la glutaraldéhyde nous ait permis d'obtenir des échantillons avec moins de fibres en

apparence, seule une fraction (moins de 50%) de la quantité de polymère utilisée au départ passait à travers le filtre dont les mailles mesuraient environ 0,8 mm.

Tableau 8. Échantillons d'alginate, agent gélifiant et agent d'enrobage utilisés lors des tests visant à identifier les conditions nécessaires à la formation de billes gélifiées à l'aide du deuxième montage

Polymère	Agent gélifiant (m/v)	Agents d'enrobage (m/v)	Observations
Protanal LF10 / 60 Haute teneur en acide guluronique	2 % $\text{Ca}^{++}$ sous forme de $\text{CaCl}_2 \bullet$ $2\text{H}_2\text{O}$	1% chitosane + 10% lignosulfonate	Les capsules obtenues sont régulières et ont un diamètre variant entre 40 $\mu\text{m}$ et 120 $\mu\text{m}$ .

Le compromis du noyau d'alginate enrobé de chitosane a aussi fonctionné avec le montage d'encapsulation ultrasonique. Dans des conditions similaires à celles testées auparavant avec la technique de « drop-wise », il nous a été possible d'obtenir des microbilles d'alginate enrobées de chitosane dont le diamètre varie entre 40  $\mu\text{m}$  et 120  $\mu\text{m}$ . En raison du caractère permanent de la gélification de la chitosane, nous avons retenu cette construction de capsules pour l'encapsulation de la culture KB1.

#### 4.2.4.3. Encapsulation du consortium KB1 avec le deuxième montage : ultrasonique

L'encapsulation du consortium KB1 a été tentée avec le protocole du deuxième montage. Les cellules ont tout d'abord été encapsulées dans des particules d'alginate qui ont été à leur tour enrobées avec une solution de chitosane stabilisée avec du lignosulfonate. Le profil de déhalogénéation du PCE pour ces cellules encapsulées a ensuite été déterminé (figure 27). Le profil de cellules microbiennes en suspension libre a aussi été obtenu (figure 28).

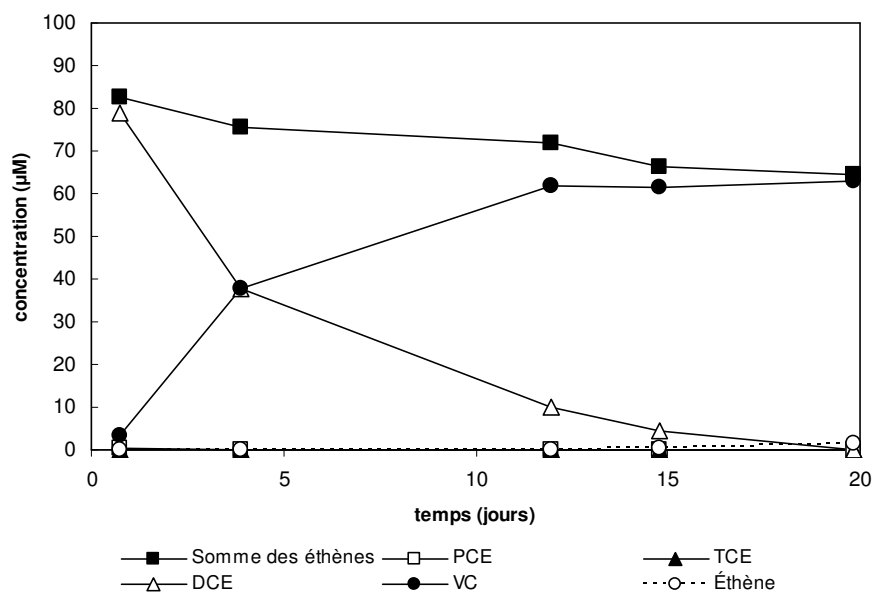


Fig. 27. Profil de déhalogénéation du PCE par la culture KB1 immobilisée dans des capsules préparées selon le protocole du deuxième montage. La concentration de protéines au départ est de 82,4 mg/L et les valeurs sont les moyennes de duplicatas; l'écart est au maximum de 20%.

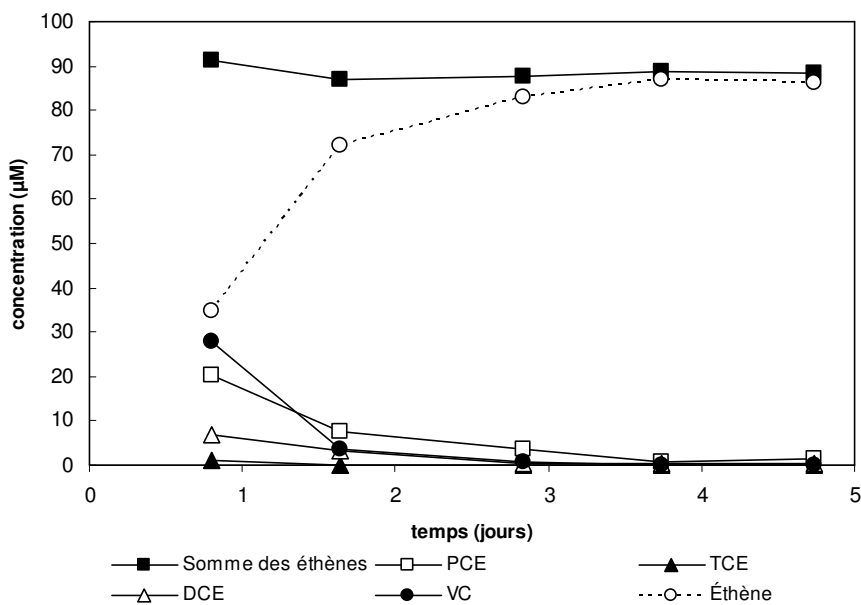


Fig. 28. Profil de déhalogénéation du PCE par la culture KB1 en suspension libre. La concentration de protéines au départ est de 85,0 mg/L et les valeurs sont les moyennes de duplicatas; l'écart est au maximum de 15%.

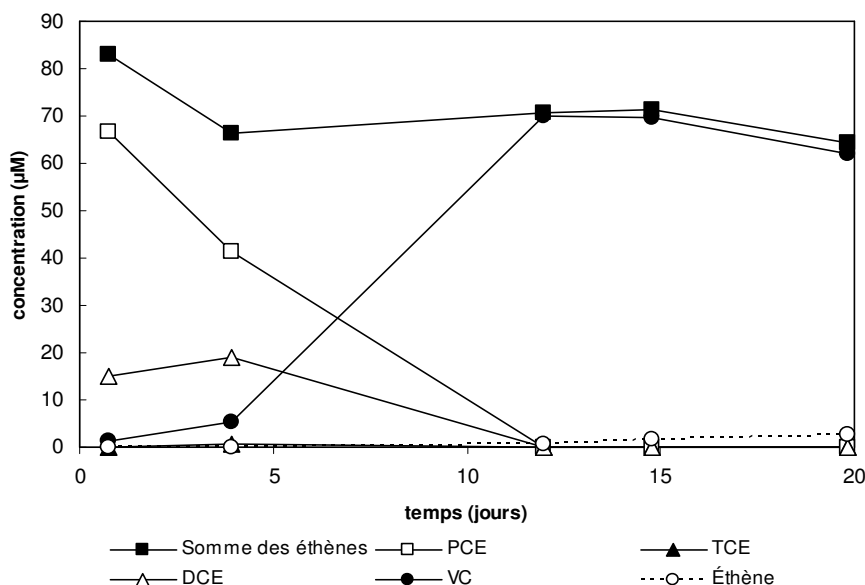


Fig. 29. Profil de déhalogénéation du PCE par la culture KB1 immobilisée dans des capsules préparées selon le protocole du deuxième montage et contaminées par une quantité inconnue d'oxygène. La concentration de protéines au départ est de 82,4 mg/L et les valeurs sont les moyennes de duplicatas; l'écart est au maximum de 20%.

Dès les premiers essais, nous avons remarqué que la culture encapsulée avait un profil différent des cellules libres puisque le PCE était quasi-instantanément converti en DCE à la première journée des expériences (figure 27). Le DCE était ensuite converti en VC pendant les jours qui suivent et des traces d'éthène apparaissaient vers la quinzième journée. À 20 jours, le VC représentait environ 97% des éthènes d'intérêts présents. Dans le cas des cellules libres (figure 28), les profils observés étaient similaires aux profils obtenus lors des expériences de détermination de l'effet de la biomasse sur les profils de déhalogénéation et présenté à la figure 22 : plus de 80% du PCE initial était converti dans la première journée et il y avait une accumulation des intermédiaires chlorés. L'éthène était alors le produit majoritaire de la réaction dès le premier jour avec une concentration de 34  $\mu\text{M}$ . La figure 29 présente un profil de déhalogénéation de cellules encapsulées contaminées par l'oxygène. Nous avons observé une diminution plus lente de la déhalogénéation du PCE par rapport aux échantillons de cellules libres. Tout comme les cellules encapsulées non-contaminées, le profil de la figure 29 montre une apparition marquée du DCE par rapport au VC (15% vs. 2%) avant la fin de la première journée et le VC représentait plus de 95% des éthènes présents à la 20<sup>e</sup> journée de l'expérience.

#### 4.2.4.4. Résumé des résultats et conclusion sur le deuxième montage : microencapsulation par atomisation avec ultrasons

Deux indices de survie ont été utilisés pour déterminer la survie des bactéries au processus d'encapsulation : protéines et cellules viables. Les expériences ont été faites avec des cellules de *E. coli* comme modèle principalement en raison de la rapidité avec laquelle nous pouvions obtenir un nombre de cellules suffisantes comparé à la culture KB1. Les résultats obtenus avec le premier indice, la quantité de protéines, nous ont permis de croire que le processus a un impact négatif significatif sur le nombre de cellules intactes. En effet, après le processus, nous avons recueillis par centrifugation et lavage les cellules intactes en délaissant les protéines en suspension libre. Le tableau 5 montre que la concentration de protéines dans les échantillons de cellules soumises aux vibrations ultrasoniques était plus petite que dans les échantillons non-soumis à ces vibrations. Ainsi, environ 29,6% des cellules auraient été détruites par le processus et éliminées lors des étapes de centrifugation et lavage qui ont suivies l'atomisation. En tenant compte du premier indice, nous avons estimé la survie des cellules au processus à 70,4%. Le deuxième indice utilisé, le décompte des unités formatrices de colonies par volume, n'a pas montré un impact significatif des vibrations ultrasoniques sur les bactéries. En effet, en tenant compte de la variation sur les résultats obtenus, la valeur de cellules viables par ml de solution pour les échantillons soniqués  $(2,83 \pm 0,62) \cdot 10^9$  CFU / ml est similaire à la valeur pour les échantillons contrôles  $(3,04 \pm 0,34) \cdot 10^9$  CFU / ml. Le processus aurait donc eu un impact négatif sur la survie des cellules pour l'un des indices utilisé (protéines). Pour cette raison, nous avons considéré l'encapsulation par atomisation avec ultrasons comme une méthode d'encapsulation à considérer pour des tests plus poussés.

Avec le système d'encapsulation avec ultrasons, nous avons testé les polymères alginate et chitosane pour fabriquer des capsules ayant un diamètre près de 100  $\mu$ m. Nous avons également testé la fabrication de microcapsules d'alginate enrobées avec de la chitosane et gélifiées en présence de lignosulfonate. Le premier polymère utilisé, l'alginate Protanal LF10 / 60, a donné des résultats satisfaisant c'est-à-dire que nous avons pu obtenir des capsules ayant un

diamètre entre 30  $\mu\text{m}$  et 160  $\mu\text{m}$  avant les étapes de filtration lorsque l'alginate est gélifiée en présence d'ions calcium. Ces résultats représentaient une progression par rapport au premier montage puisque la distribution de taille était plus petite : 30  $\mu\text{m}$  – 160  $\mu\text{m}$  pour l'atomisation ultrasonique vs. 5  $\mu\text{m}$  - 400  $\mu\text{m}$  pour l'atomisation avec jet d'air. Avec l'alginate, nous avons aussi utilisé une combinaison d'ions calcium et chitosane dans le but de gélifier la matrice d'alginate et l'enrober de chitosane en une seule étape. Malheureusement, la présence de fibres a été observée lors de ces essais. Nous pensons que la présence de fibres d'alginate dans la solution gélifiante indique que les particules liquides n'ont pu garder leur forme lors de la gélification et se sont étirées sous les forces mécaniques présentes dans la solution gélifiante. Ce phénomène pourrait être dû à la trop grande vitesse d'agitation du liquide ou à une réaction de gélification trop lente. La deuxième hypothèse nous semble la plus plausible dans ce cas puisque la vitesse d'agitation de la solution gélifiante était la même lors des expériences précédentes avec une solution gélifiante uniquement composée de  $\text{CaCl}_2$  en solution. Enfin il nous a été possible avec le deuxième montage d'encapsulation d'obtenir des billes d'alginate avec un diamètre près de 100  $\mu\text{m}$  en utilisant de l'alginate à faible viscosité et une solution gélifiante contenant des ions de calcium. Comme lors des tests préliminaires, la chitosane s'est avérée difficile à gélifier dans les conditions testées. Pour toutes les conditions présentées au tableau 7, la présence de courtes fibres de chitosane gélifiées ont été observées, indiquant que les particules liquides n'ont pas gardé leur forme sphérique une fois plongées dans la solution gélifiante. Lors des étapes de filtration, ces fibres se sont accumulées dans les filtres et nous avons constaté tout comme lors de l'utilisation du premier montage, la faible efficacité du système. Ces résultats nous laissent croire que la chitosane ne pourrait être utilisée de manière efficace avec ce système parce que la composition et le pH des solutions gélifiantes ne permettrait pas une gélification des particules assez rapide pour qu'elles résistent aux forces présentes dans le liquide en mouvement dans la solution gélifiante. Une autre approche qui a donnée des résultats satisfaisants est la formation de microbilles d'alginate enrobée de chitosane. En effet, le protocole développé avec le second montage a permis la création de microbilles d'une taille variant entre 40  $\mu\text{m}$  et 120  $\mu\text{m}$ . Bien que la préparation des billes exigeait un plus grand nombre d'étapes où une contamination biologique ou chimique (traces d'oxygène) était possible, nous pensons que la couche additionnelle de chitosane gélifiée représenterait une construction plus stable que des billes dont la matrice est uniquement composée d'alginate. Pour le projet actuel cependant, cette construction représentait

une option supplémentaire que nous pourrions utiliser lors de l'élaboration du protocole d'encapsulation des cellules bactériennes.

Finalement, nous avons jugé le processus d'encapsulation ultrasonique comme satisfaisant aux niveaux de la production des capsules et de la survie des cellules avec des bactéries de *E. coli* comme modèle. Cependant, lors de l'encapsulation des cultures d'intérêts, les profils de déhalogénéation du PCE ont montré une absence de conversion finale du VC vers l'éthène. Deux raisons pouvaient expliquer cette absence de conversion : la contamination par l'oxygène et la destruction de cellules jouant un rôle important dans cette conversion. En comparant les profils de cultures immobilisées contaminées par l'oxygène (figure 29) avec des cultures immobilisées saines (figure 27), nous croyons que la contamination par l'oxygène à elle seule ne peut expliquer l'absence de conversion finale vers l'éthène dans les cultures immobilisées saines puisqu'elles conservaient la capacité de déhalogéner rapidement le PCE. La destruction de microorganismes responsables de cette transformation resterait donc la seule option et nous ne pouvions dans le cadre de ce projet diminuer l'énergie d'atomisation ou le temps pendant lequel les microorganismes étaient exposés aux vibrations ultrasoniques. Pour cette raison, nous avons envisagé un troisième montage d'encapsulation qui nous permettrait d'encapsuler la culture et d'obtenir une conversion complète du PCE en éthène.

#### **4.2.5. Troisième montage : encapsulation par « drop-wise »**

L'encapsulation par « drop-wise » est la dernière méthode d'encapsulation qui a été testée. Jusqu'alors, il n'avait pas été possible d'immobiliser le consortium de bactéries sans observer d'impact négatif sur son activité de déhalogénéation du PCE. Ainsi, c'est avec des capsules fabriquées avec le troisième montage qu'il a été possible de réaliser plusieurs expériences comparant l'activité de déhalogénéation de cellules libres et de cellules encapsulées. Aussi, cette méthode d'encapsulation nous a permis d'observer l'effet de la capsule sur l'activité de déhalogénéation d'échantillons contaminés par des quantités connues d'oxygène dont les résultats sont présentés dans une autre section (section 4.3) de ce travail.



La méthode utilisée pour le troisième montage était la même que celle utilisée pour évaluer les polymères au début du projet. Nous avons choisi l'alginate enrobée de chitosane comme formule pour fabriquer les capsules afin d'allier la rapidité de la gélification de l'alginate à la nature covalente des liens entre la chitosane et le lignosulfonate.

#### 4.2.5.1. Encapsulation du consortium KB1 avec le troisième montage : « drop-wise »

Le profil de déhalogénéation de cellules encapsulées et de cellules libres a été déterminé avec deux concentrations initiales de biomasse: 55 mg/L et 85 mg/L de protéines. Le profil de cellules encapsulées (figure 30 et 32) est suivi du profil de cellules libres (figure 31 et 33).

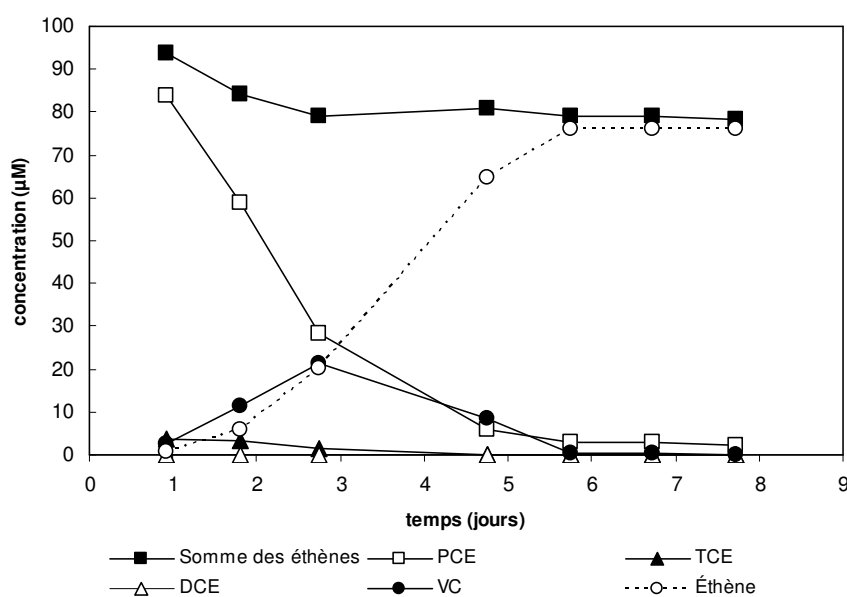


Fig. 30. Profil de déhalogénéation du PCE par la culture KB1 immobilisée dans des capsules préparées selon le protocole du troisième montage (drop-wise). La concentration de protéines au départ est de 55,0 mg/L et les valeurs sont les moyennes de duplicatas; l'écart est au maximum de 10%.

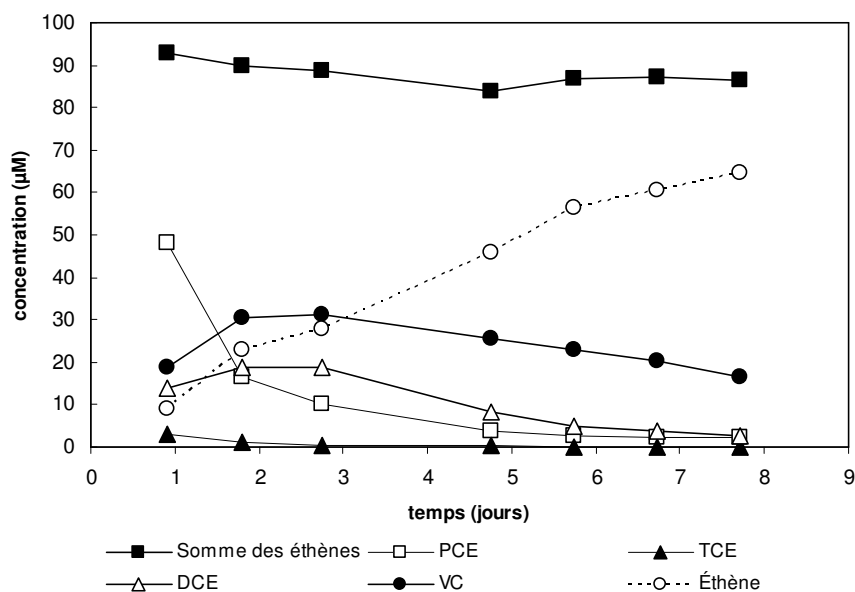


Fig. 31. Profil de déhalogénéation du PCE par la culture KB1 en suspension libre. La concentration de protéines au départ est de 55,0 mg/L et les valeurs sont les moyennes de duplicatas; l'écart est au maximum de 10%.

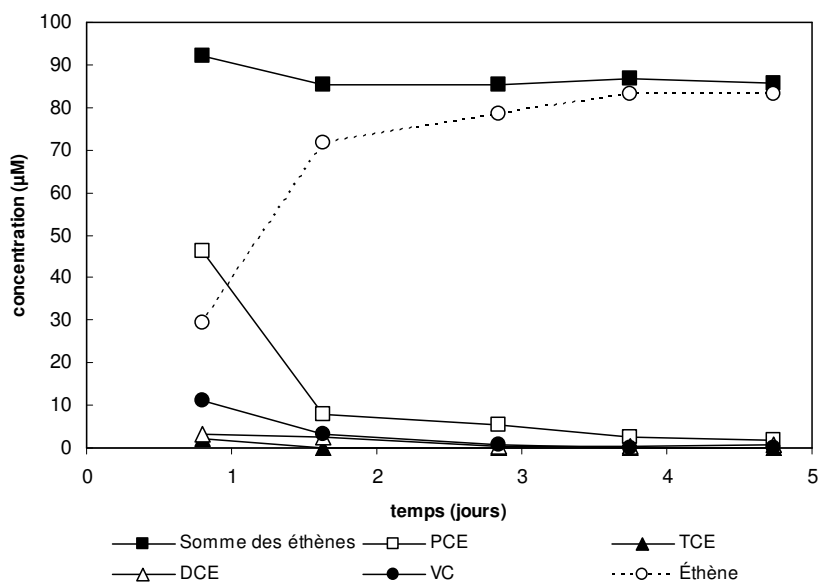


Fig. 32. Profil de déhalogénéation du PCE par la culture KB1 immobilisée dans des capsules préparées selon le protocole du troisième montage (drop-wise). La concentration de protéines au départ est de 85,0 mg/L et les valeurs sont les moyennes de duplicatas; l'écart est au maximum de 10%.

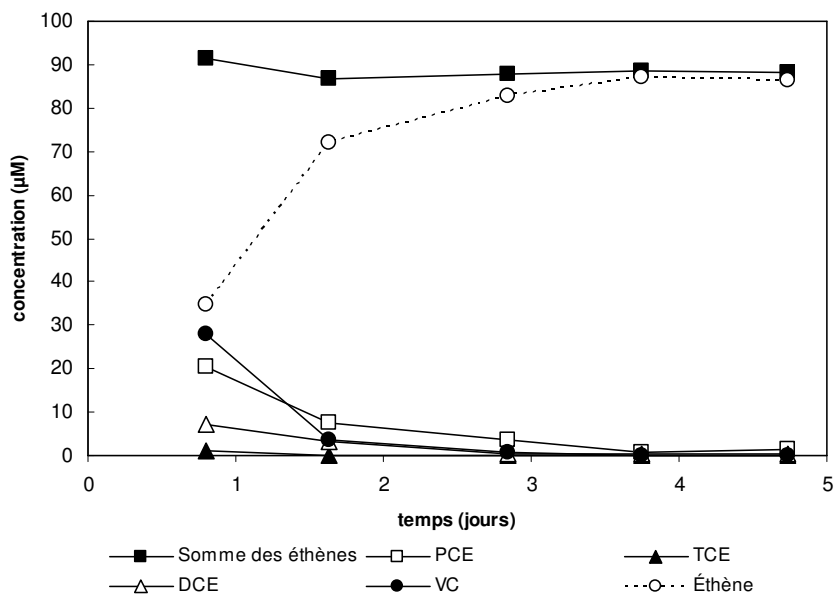


Fig. 33. Profil de déhalogénéation du PCE par la culture KB1 en suspension libre. La concentration de protéines au départ est de 85,0 mg/L et les valeurs sont les moyennes de duplicatas ; l'écart est au maximum de 20%.

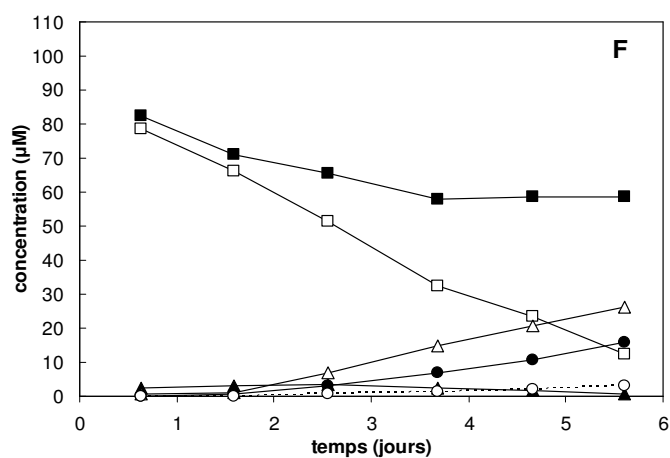
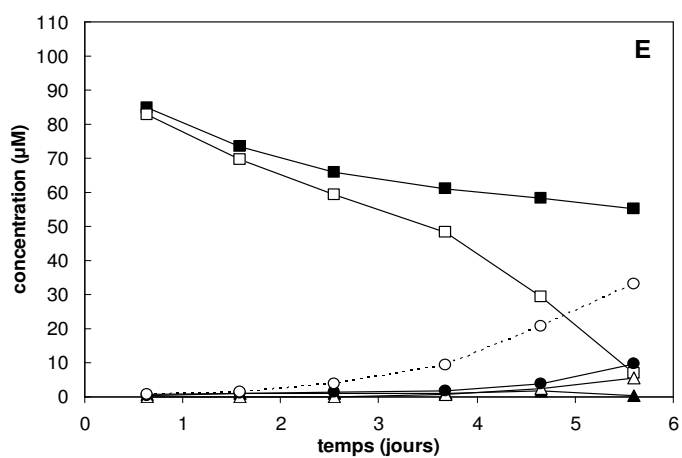
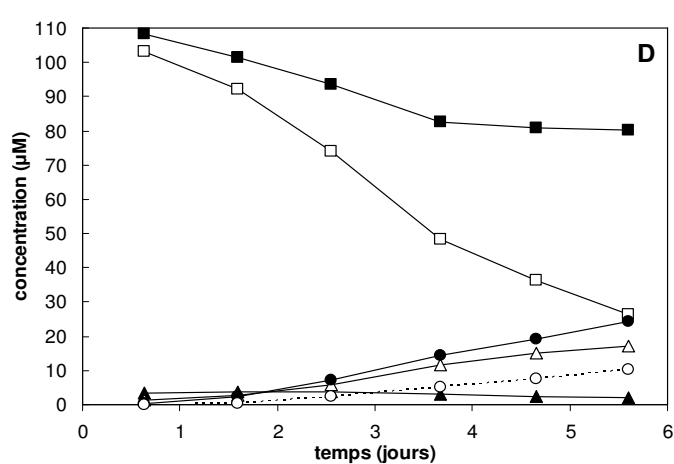
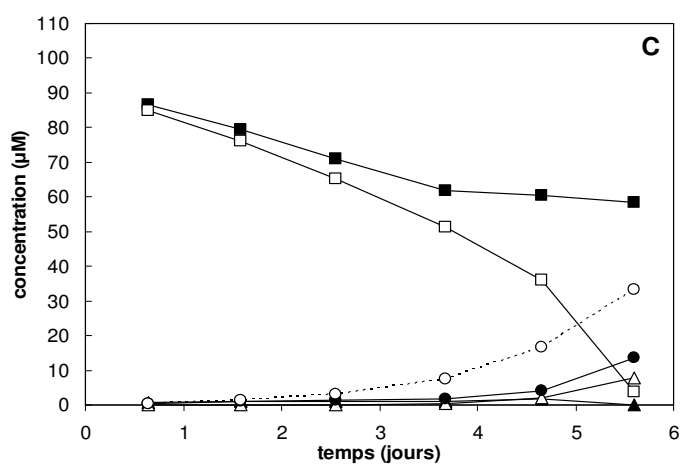
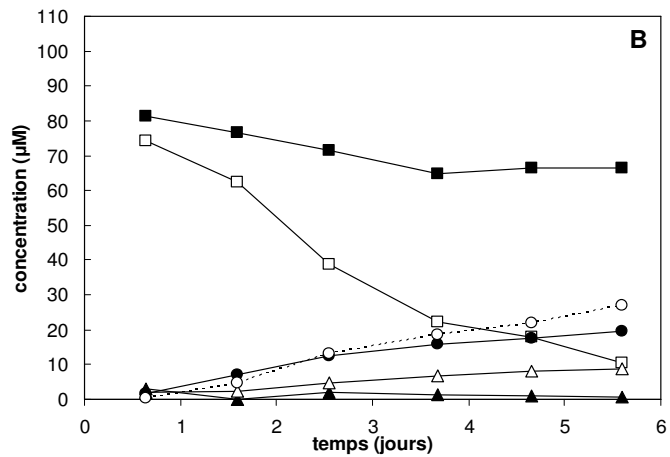
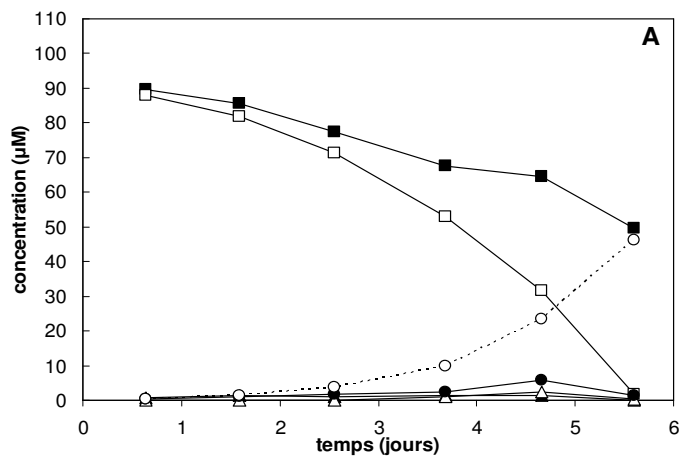
Nous avons pu faire des comparaisons similaires pour les deux valeurs de biomasses (55 mg/L et 85 mg/L de protéines) entre les profils des cellules encapsulées et des cellules libres. Premièrement, la vitesse apparente de déhalogénéation du PCE pendant les deux premiers jours de l'expérience est plus faible avec les cellules encapsulées que les cellules libres. Cette différence semble indiquer que les cellules encapsulées transformeraient moins rapidement le PCE que les cellules libres dans la première phase de la déhalogénéation du PCE. Deuxièmement, l'accumulation des intermédiaires DCE et VC a été plus faible avec les cellules encapsulées. Par exemple, nous avons pu observer dans les échantillons de cellules encapsulées avec une concentration de protéines initiale de 55,0 mg/L (figure 30) que la concentration maximale de VC pendant toute la durée de l'expérience a atteint 22 µM avec des traces de DCE. Pour la même biomasse avec des cellules libres (figure 31), la concentration maximale de VC a atteint 31 µM et le DCE, 18 µM. Troisièmement, ces différences dans l'accumulation des intermédiaires ont fait en sorte que, pour les échantillons ayant une concentration initiale de protéines de 55,0 mg/L, la vitesse apparente d'apparition d'éthène pendant les deux premiers jours a été plus grande pour les cellules encapsulées que les cellules libres. Enfin, en comparant les profils des figures 30 et 31, nous avons remarqué pour les échantillons contenant 55,0 mg/L de protéines que les cellules

encapsulées réussissaient à convertir la quasi-totalité du PCE initial en éthène alors que pour les cellules libres, l'éthène ne représentait que 73 % des éthènes présents au 8<sup>e</sup> jour de l'expérience.

#### **4.3. Effets de l'encapsulation lors de la contamination par l'oxygène**

Lors de la revue des connaissances sur le sujet de l'encapsulation, nous avons vu plusieurs exemples d'applications où la matrice polymérique favorisait ou protégeait l'activité métabolique des cellules encapsulées. Cette constatation nous a amené à croire que nous pouvions tirer des avantages de l'encapsulation de la culture KB1. L'un des obstacles à l'utilisation du consortium enrichi comme solution pour la biorémédiation (économiquement viable) des sites contaminés est la faible résistance du consortium à l'oxygène. Nous pensons que l'encapsulation permettrait d'obtenir la propriété de résistance nécessaire pour l'utilisation du consortium en situation réelle. C'est dans le but d'explorer cette propriété potentielle de l'encapsulation que nous avons voulu évaluer l'impact de la contamination par l'oxygène sur des cultures encapsulées et des cultures en suspension libre.

La figure suivante (figure 34) montre les profils de déhalogénéation du PCE par des cellules encapsulées et des cellules libres lors d'une expérience où des échantillons ont été volontairement contaminés par des concentrations connues d'oxygène. Différents volumes d'oxygène pur ont donc été injectés dans des échantillons préparés en duplicata. Les deux premiers profils montrent le profil moyen d'échantillons contrôle (sans oxygène) puis, les profils suivants montrent des échantillons contaminés par une quantité croissante d'oxygène correspondant à 0,5%, 0,7% et enfin 0,9% du volume total des échantillons.



■ Somme des éthènes    □ PCE    ▲ TCE    △ DCE    ● VC    ...○... Éthène

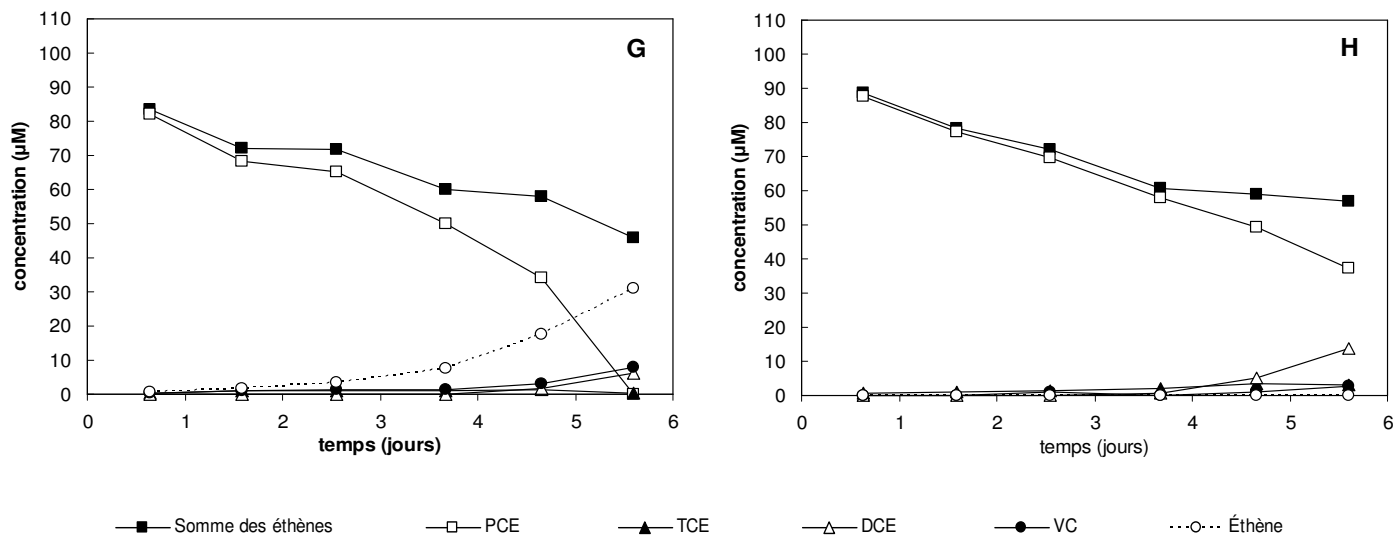


Fig. 34. Profil de déhalogénéation du PCE par des cultures KB. Dans la colonne de gauche, les échantillons de cellules encapsulées et dans la colonne de droite, les échantillons de cellules libres. A et B : échantillons contrôles non-exposés à l'oxygène, C et D : échantillons exposés à 0,5 % (v/v) d'oxygène, E et F : échantillons exposés à 0,7 % (v/v) d'oxygène, G et H : échantillons exposés à 0,9 % (v/v) d'oxygène. La concentration initiale de protéines dans les échantillons est de  $54,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  et les valeurs pour chaque graphique sont les moyennes de duplicatas ; l'écart est au maximum de 20%.

Afin de pouvoir comparer les profils des différents échantillons, nous avons, pour chaque échantillon, pris la concentration du PCE et de ses produits de déhalogénéation au temps 5,6 jours. Ensuite, nous avons utilisé ces valeurs de concentration pour calculer le pourcentage des molécules initiales de PCE dans chaque échantillon auxquelles il a été enlevé aucun, deux ou plus, trois ou plus ou les quatre atomes de chlores. Par exemple, le pourcentage de molécules qui ont perdues au moins trois atomes de chlore est le résultat de la contribution des concentrations d'éthène et de VC mesurées dans les échantillons à ce moment.

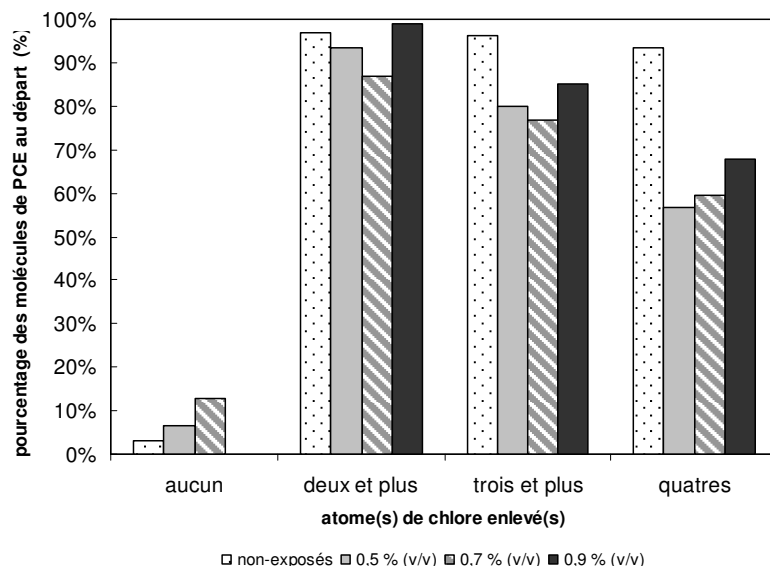


Fig. 35. Pourcentage des molécules de PCE qui ont perdu aucun, au moins deux, au moins trois ou les quatre atomes de chlore au temps 5,6 jours dans les échantillons de cellules encapsulées avec le protocole du troisième montage (drop-wise). Les différentes conditions indiquées correspondent à la concentration initiale d'oxygène ( $O_2$ ) dans les bouteilles.

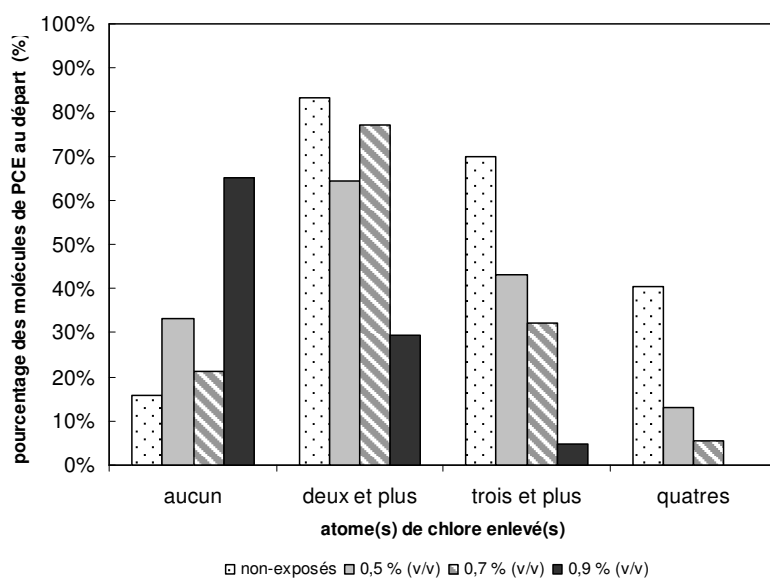


Fig. 36. Pourcentage des molécules de PCE qui ont perdu aucun, au moins deux, au moins trois ou les quatre atomes de chlore au temps 5,6 jours dans les échantillons de cellules libres. Les différentes conditions indiquées correspondent à la concentration d'oxygène dans les bouteilles.

La figure 35 montre les résultats de ces calculs de concentrations pour les cellules encapsulées. Pour les deux premiers groupes de colonnes correspondant à la conversion du PCE vers le DCE, nous avons observé un faible changement dans les pourcentages pour les quatre conditions de contamination par l'oxygène. Pour les concentrations d'oxygène testées, la déhalogénéation du PCE vers le DCE était donc peu affectée. La troisième colonne nous a permis d'observer une baisse de la conversion du DCE vers le VC puisque le pourcentage des éthènes d'intérêts qui ont perdu trois atomes de chlore ou plus a chuté de 96% à 79% lorsqu'une contamination de 0,5% d'oxygène était présente. Cependant, les pourcentages se sont maintenus près de 80% quand le niveau d'oxygène a été augmenté ce qui indique que les cultures encapsulées étaient peu affectées par cette hausse du pourcentage d'oxygène. Une observation similaire a pu être faite pour les éthènes qui ont perdu tous leurs atomes de chlore : le premier niveau de contamination par l'oxygène a fait chuter le pourcentage de molécules dans cette catégorie de 92% à 57% et les niveaux plus élevés de contamination affectaient peu ce dernier pourcentage.

Pour les cellules libres contaminées par l'oxygène (figure 36), la déhalogénéation du PCE fut touchée dès le début : le pourcentage de PCE dans les échantillons contrôle était de 16% et les valeurs augmentaient progressivement jusqu'à 64% pour les échantillons contenant 0,9% d'oxygène. Pour les autres étapes de la conversion du PCE vers DCE, DCE vers VC et VC vers l'éthène, nous avons observé une baisse de l'activité de déhalogénéation entre chaque augmentation des niveaux de contamination d'oxygène. Ces résultats suggèrent que les différentes étapes de la déhalogénéation du PCE ont été directement affectées par l'oxygène et que la baisse d'activité variait en fonction de l'augmentation des niveaux de contamination.



## 5. Discussion sur l'impact de l'encapsulation sur l'activité du consortium enrichi en *Dehalococcoides ethenogenes*

Ce projet nous a amené à combiner les avantages possibles offerts par l'encapsulation avec l'activité de déchloration particulière d'un consortium enrichi en *D. ethenogenes*, le consortium KB1. L'objectif principal de ce projet était de proposer un modèle d'encapsulation de microorganismes dans le but de convertir complètement le polluant PCE en éthène. Lors des expériences réalisées pour atteindre cette cible, nous avons obtenu plusieurs résultats montrant l'impact de l'encapsulation sur le consortium enrichi. Nous discuterons ici de ces effets de l'encapsulation en abordant dans un premier temps l'activité de déhalogénéation du PCE par la culture KB1 en suspension libre (non-encapsulée). Par la suite, nous exposerons l'impact de l'encapsulation sur l'activité de la culture selon le type de montage utilisé : encapsulation ultrasonique ou encapsulation avec la technique de « drop-wise ». Finalement, nous discuterons des avantages de l'encapsulation lorsque les cellules sont exposées à l'oxygène.

### Activité de conversion du PCE en éthène du consortium KB1

En raison de la grande diversité de microorganismes présents dans le consortium utilisé au départ, il est possible que plusieurs mécanismes de déhalogénéation soient responsables de la conversion du PCE en éthène. Cependant, le caractère enrichi en *D. ethenogenes* des cultures, la composition du milieu de culture et la transformation des éthènes détectés dans les échantillons nous permettent de croire que le mécanisme principal de la conversion du PCE en éthène était la déchloration réductrice. Dans ce projet, nous avons souligné aux sections 4.1.3. et 4.1.4. le double rôle de l'acide lactique à la fois comme source d'énergie pour la déchloration mais aussi comme source de carbone permettant l'augmentation de la biomasse dans les échantillons. Les résultats les plus intéressants ont été réalisés lors des expériences portant sur les effets de l'accroissement du nombre de microorganismes (biomasse) sur les profils de déhalogénéation du PCE. Nos résultats suggèrent (figure 23) que la vitesse de déhalogénéation du PCE en éthène, mis en évidence par l'apparition de l'éthène, ne varie pas toujours de façon linéaire en fonction de la biomasse. Des résultats obtenus par l'équipe Maymó-Gatell, Anguish et Zinder (51) nous ont

fournis des éléments supplémentaires pour supporter nos résultats. En effet, dans la culture pure de *D. ethenogenes* utilisée par cette équipe, la conversion finale du VC vers l'éthène ne se fait pas avant que la concentration du PCE soit faible. Nos profils de déhalogénéation du PCE montrent aussi cette tendance à une plus grande accumulation d'éthène dès que le PCE représente de 5% à 10% des éthènes. Lors de la reconstitution du système de déhalogénéation du PCE *in vitro* à l'aide des deux enzymes responsables de cette réaction chez *D. ethenogenes* (42), la même relation entre l'apparition d'éthène et la faible présence du PCE a été observée. Il est important de rappeler ici que la conversion du PCE en TCE pour ces bactéries serait due à l'enzyme PCE-RDase alors que la conversion successive du TCE en DCE, VC, puis éthène serait attribuable à l'enzyme TCE-RDase. En plus de cette relation particulière entre la concentration de PCE et la vitesse de conversion des intermédiaires, il faut noter le fait que la déhalorespiration avec les éthènes chlorés est la principale source d'énergie pour ces cultures et que l'acide lactique peut aussi être utilisé comme source de carbone. Nous pensons donc que la variation du pourcentage d'éthène observé en fonction de la biomasse initiale (figure 23) peut être expliquée par un accroissement de la vitesse de déhalogénéation du PCE chez les cultures ayant une biomasse par unité de volume plus importante, ce qui se traduit par un accroissement de l'accumulation d'éthène lorsque la concentration de PCE atteint le seuil de 5% à 10%. Enfin, nos résultats montrent que le consortium utilisé peut déhalogéner le PCE en suivant un profil général similaire à ceux observés dans la littérature avec la culture pure ou avec un système reconstitué *in-vitro*.

### **Impact de l'encapsulation avec le deuxième montage: encapsulation ultrasonique**

Lors des expériences avec le montage d'encapsulation ultrasonique, des constructions stables de microcapsules ont été obtenues. Il nous a été possible de procéder à l'encapsulation des cultures KB1 dans des microbilles d'alginate enrobées de chitosane. Les profils de déhalogénéation du PCE par ces billes ont été comparés à des échantillons contrôles contenant uniquement des cellules en suspension libre. Les échantillons contrôles (figure 28) ont montré des profils de déhalogénéation attendus avec des cultures qui ont une biomasse élevée (85 mg/L de protéines) c'est-à-dire qu'on observe une disparition très rapide du PCE et une faible accumulation d'intermédiaires chlorés. Les échantillons de cellules encapsulées (figure 27) ont cependant montré un type de profil encore jamais observé auparavant avec ces cultures. Dès la

première journée, seulement quelques traces de PCE ont été détectées et la proportion d'éthènes chlorés sous forme de DCE s'élevait à 95% des éthènes présents. De plus, les profils ont montré une production d'éthène aussi faible que lors des premiers tests réalisées avec des cultures contaminées par de l'oxygène. La contamination par l'oxygène à elle seule n'arrivait pas à expliquer le profil de déhalogénéation du PCE : comme nous avons pu observer plus tôt avec plusieurs cultures, la contamination par l'oxygène cause normalement un ralentissement de la déhalogénéation du PCE. Nous avons d'ailleurs pu observer ce phénomène dans les échantillons de cellules encapsulées et contaminés par l'oxygène (figure 29). Nous pensons que les profils obtenus avec des cellules encapsulées avec le deuxième montage seraient le résultat de plusieurs facteurs. Premièrement, les bactéries seraient soumises aux vibrations ultrasoniques lors de leur passage dans le bec de l'atomiseur et nous avons montrés que ces vibrations pouvaient détruire au moins une partie des cellules lors des tests de survie en utilisant *E. coli* comme modèle. Il est raisonnable de penser que tous les types de microorganismes qui composent la culture KB1 ne réagissaient pas de la même façon aux effets néfastes de ces vibrations (pression, chaleur) et que par conséquent, la composition de la communauté bactérienne présente dans les cultures fut changée. Pour vérifier cette dernière explication, nous pourrions envisager un test d'analyse phylogénétique des séquences 16S d'ADN ribosomale présentes dans le consortium avant et après traitement. Deuxièmement, les différentes étapes additionnelles pour la préparation des échantillons de cellules encapsulées comme l'enrobage à la chitosane, les lavages et la stabilisation à la lignosulfonate étaient susceptibles de contaminer les échantillons avec des traces d'oxygène. Ainsi, bien que la contamination par l'oxygène ne soit pas le seul facteur, elle aurait néanmoins pu jouer un rôle dans le profil de déhalogénéation observé à la figure 27. Finalement, les bactéries encapsulées étaient dans un environnement différent des cellules en suspension libre et nous ne sommes pas en mesure de déterminer précisément les effets que ce nouvel environnement a eu sur l'activité des cellules (ex. différents niveaux d'ARN messager, reproduction et survie de différentes bactéries).

### **Impact de l'encapsulation avec le troisième montage: encapsulation par « drop-wise ».**

Nous croyons que notre objectif d'obtenir un modèle stable de cellules bactériennes encapsulées pouvant servir à la déhalogénéation du PCE a été atteint lors des expériences réalisées avec le troisième montage. Nous sommes arrivés à cette conclusion suite aux résultats montrant

les profils de cellules encapsulées de cellules en suspension libre (figure 30 à 33). En raison du nombre d'échantillons, il ne nous a pas été possible de procéder à des études statistiques poussées des résultats mais nous avons néanmoins pu dégager des tendances qui se répétaient dans plus d'une expérience.

La première observation réalisée fut la disparition moins rapide du PCE dans les échantillons de cellules encapsulées. En comparant les profils de déhalogénéation aux figures 30, 31 et 34, nous avons pu noter une tendance à un retard d'environ un jour entre les échantillons de cellules encapsulées et les cellules libres pour des concentrations de PCE entre 80  $\mu$ M et 10  $\mu$ M. En d'autres mots les cellules libres atteignaient une concentration de PCE donnée environ un jour avant les cellules encapsulées. Nous expliquons mal ce phénomène parce que nous avons montré lors des tests d'absorption que le PCE n'était pas absorbé dans la matrice des capsules. Aussi, il est peu probable que la matrice polymérique agisse comme une barrière importante puisque les pores des capsules d'alginate laissent généralement diffuser les molécules dites petites comme le glucose ou l'insuline mais pas les molécules qui ont un plus grand poids moléculaire comme l'albumine ou les immunoglobulines (65). Bien que ce premier impact de l'encapsulation sur l'activité du consortium ne soit pas en faveur de l'encapsulation, il a été largement compensé par le deuxième impact.

La deuxième observation réalisée est que les concentrations des intermédiaires DCE et VC dans les échantillons de cellules encapsulées restaient plus faibles que dans les échantillons de cellules en suspension libre. L'encapsulation permettrait donc la formation d'un environnement où la concentration des éthènes chlorés plus toxiques (DCE et VC) serait plus faible. Ces différences nous ont apparues plus évidentes à des concentrations de protéines bactériennes dans les échantillons de 55 mg/L (fig. 30 et 31). Il ne nous a pas été possible de mesurer la concentration des éthènes chlorés à l'intérieur des capsules mais nous proposons l'hypothèse que la faible accumulation d'intermédiaires est due au fait que les produits de déhalogénéation du PCE se retrouvent dans un espace restreint où un plus grand nombre de cellules actives sont présentes. Par conséquent, les intermédiaires TCE, DCE et VC seraient plus rapidement réutilisés par les cellules comme accepteur d'électrons dans leur chaîne de respiration. Cette hypothèse s'inscrit dans une logique déjà avancée par l'équipe Moslemy,

Neufeld et Guiot (57) qui proposaient que la capsule crée un environnement où les constituants cellulaires des bactéries mortes étaient plus facilement repris par les autres cellules présentes dans la capsule.

Finalement, les profils obtenus avec des cellules encapsulées avec le troisième montage nous ont montré une déhalogénéation complète du PCE en éthène avec une faible accumulation d'intermédiaires (figures 30 à 33). En comparant le profil de déhalogénéation du PCE des cultures encapsulées et des cultures en suspension libre, nous sommes en mesure d'affirmer que notre premier objectif a été atteint : le système développé avec le troisième montage est fonctionnel et permet l'encapsulation d'une culture de cellules bactériennes qui ont une activité de déhalogénéation du PCE en éthène. Dans ce cas, la conversion complète du PCE a été observée dans les échantillons de cellules encapsulées et la tendance répétée (figures 30, 31, 34) est que la vitesse apparente de cette déhalogénéation était plus grande que dans les échantillons de cellules libres.

### **Impact de l'encapsulation lors de la contamination par l'oxygène**

Nous avons utilisé le système d'encapsulation développé avec le troisième montage (technique « drop-wise ») pour évaluer une condition qui serait rencontrée par des capsules dans une perspective d'application en biorémediation de sols contaminés. À la lumière des difficultés posées par la sensibilité de la culture à l'oxygène, nous avons voulu comparer les profils de déhalogénéation de cultures encapsulées et en suspension libre exposées à différents niveaux de contamination par l'oxygène. La figure 34 montre les profils obtenus suite aux expériences réalisées dans ce but. Les cultures non exposées à l'oxygène en A et en B nous ont permis d'observer une nouvelle fois l'impact de l'encapsulation sur le profil de déhalogénéation du PCE : réduction de la vitesse de disparition du PCE et réduction de l'accumulation des intermédiaires chlorés. Par la suite, les échantillons ont été contaminés par de faibles volumes d'oxygène qui représentent 0,5%, 0,7% et 0,9% du volume total des échantillons. Dans les échantillons de cellules libres, nous avons observé une diminution graduelle de la déhalogénéation de PCE accompagnée d'une diminution de l'accumulation d'éthène et une augmentation de l'accumulation des intermédiaires 1,2-DCE et VC. Pour les cultures encapsulées, nous avons

observé un phénomène semblable au plus faible niveau de contamination d'oxygène mais les effets semblent moins importants.

Dans le but de mieux comprendre l'impact de la contamination de l'oxygène sur les différents échantillons, nous avons rapporté la concentration de tous les éthènes chlorés d'intérêts présents à 5,8 jours après le début de l'expérience. Nous avons ensuite utilisé ces valeurs de concentration pour calculer le pourcentage de molécules de PCE présentes au départ qui ont perdu aucun, au moins un, au moins deux, au moins trois ou les quatre atomes de chlore. En tenant compte des résultats obtenus (figures 35 et 36), nous croyons qu'il est raisonnable d'avancer que les cellules encapsulées ont bénéficiées d'un effet de protection contre l'oxygène. En effet, la conversion  $\text{PCE} \rightarrow \text{DCE}$  a été peu affectée par les différents niveaux de contamination d'oxygène présents alors que pour les cellules libres nous avons observé un ralentissement de l'activité de déhalogénéation du PCE pour toutes les étapes de la conversion en éthène. La présence d'oxygène (0,5%) a aussi affecté l'étape de conversion  $\text{DCE} \rightarrow \text{VC}$  dans les échantillons de cellules encapsulées puisque le pourcentage des éthènes qui ont perdu trois atomes de carbone ou plus est passé de 96% à 79% mais ce pourcentage s'est maintenu même au plus haut niveau de contamination (0,9%). Des observations similaires ont été faites pour l'étape de déhalogénéation finale du  $\text{VC} \rightarrow \text{éthène}$ . Les cellules encapsulées semblaient donc bénéficier d'un effet protecteur contre l'oxygène. Nous croyons que cette protection serait due en grande partie à la structure de la capsule : les microorganismes se retrouvent concentrées dans un espace restreint (environ 3 mg/ml protéines) et l'oxygène qui entrerait serait consommé par les cellules en périphérie. Ce phénomène s'apparenterait à celui qu'on retrouve chez les cyanobactéries filamenteuses: les cellules spécialisées fixatrices d'azotes appelées hétérocystes gardent une activité en condition anaérobie grâce à la respiration des cellules voisines et par la respiration aux pôles de leur membrane cellulaire (86). D'autres explications dans ce sens sont aussi présentes dans la littérature. Par exemple dans les domaines du traitement des eaux, les microorganismes actifs qui forment les biofilms arrivent à limiter la pénétration d'oxygène dans les biofilms si bien que la concentration d'oxygène peut être diminuée de moitié au premier 100  $\mu\text{m}$  de la surface (90). Cette hypothèse expliquerait aussi pourquoi nous avons observé une baisse de l'activité de déhalogénéation dès qu'une faible dose d'oxygène était présente dans le milieu (les cellules en périphérie qui étaient les plus sensibles seraient détruites) et que l'activité

était peu affectée par une augmentation du niveau de contamination (la respiration des microorganismes en périphérie limiterait la pénétration d'oxygène vers l'intérieur de la capsule).

Les tendances observées supportent donc l'idée que les cellules encapsulées bénéficient d'un effet protecteur contre l'oxygène présent dans le milieu tant au plus faible niveau de contamination (0,5% oxygène) qu'aux niveaux plus élevés. Nos observations constitueraient alors un exemple supplémentaire des effets bénéfiques de l'encapsulation sur des cellules soumises à des conditions difficiles comme la présence de substances toxiques, écarts de température et pH extrêmes.

En conclusion sur l'impact de l'encapsulation sur l'activité de déchloration du consortium KB1, nous avons montré que la technique d'encapsulation choisie a une grande influence sur l'activité des cellules. La technique de « drop-wise » décrite dans ce projet a permis la création de capsules capables de convertir complètement le PCE en éthène. Comparé aux cellules libres, les cellules encapsulées semblaient avoir une activité de déhalogénéation initiale du PCE plus lente mais accumulaient moins d'éthènes chlorés intermédiaires pendant la conversion finale vers l'éthène. Les capsules permettraient aussi une conversion finale vers l'éthène plus rapide et plus complète pour les échantillons contenant 55 mg/L de protéines. Les raisons expliquant les différences entre les profils de déhalogénéation des cellules encapsulées et les cellules libres ne sont pas établies mais certaines hypothèses dont celle apportée par l'équipe Moslemy, Neufeld et Guiot (57) nous permettent de relier les différences à la proximité des cellules dans la capsule. Aussi, en soumettant des cellules encapsulées à un stress (la présence d'oxygène) nous avons pu observer l'effet protecteur de la capsule qui agirait même à des concentrations d'oxygène où les cellules libres ont normalement une activité de déhalogénéation sévèrement diminuée. Les résultats obtenus pour démontrer le rôle protecteur de la capsule n'ont pu faire l'objet d'une analyse statistique complète. Cependant nous pensons que les tendances observées ainsi que les éléments de la littérature que nous pouvons relier au sujet constituent des arguments à considérer en faveur de la technique d'encapsulation lors de l'utilisation de la culture en conditions réelles.

## Conclusions et perspectives

L'objectif principal de ce projet était de proposer un modèle stable de cellules bactériennes encapsulées pouvant servir à la déhalogénéation du PCE. Un objectif secondaire était que ce modèle soit développé en vue d'être utilisé à grande échelle pour la biorémédiation de sols contaminés. Nous croyons que notre objectif principal a été atteint avec le troisième montage. L'encapsulation avec la technique « drop-wise » nous a permis d'immobiliser un consortium de bactéries enrichies en *D. ethenogenes* en conditions anaérobie dans une matrice polymérique formée d'un noyau d'alginate gélifié en présence d'ions calcium et enrobé de chitosane gélifié par du lignosulfonate. Les profils de déhalogénéation du PCE par les cellules encapsulées (figures 30, 31 et 34) ont démontré que l'encapsulation permettait une conversion complète du PCE en éthène avec une vitesse apparente de production d'éthène supérieure. Afin d'arriver à ce modèle, nous avons dû développer nos connaissances sur les deux aspects du projet c'est-à-dire la culture bactérienne et les montages d'encapsulation.

Pour l'aspect de la culture bactérienne, nous avons utilisé un consortium enrichi en *D. ethenogenes* afin de contourner le problème du facteur manquant. Les premiers tests nous ont révélé l'importance de l'acide lactique comme donneur d'électrons et comme source de carbone pour la croissance. En utilisant la concentration de protéines comme indice de la biomasse initiale présente dans les échantillons, nous avons mis en évidence la relation entre l'activité de déchlorination et la biomasse initiale. Un élément important alors observé est qu'il existerait un seuil de concentration de PCE en dessous duquel les intermédiaires DCE et VC sont plus rapidement converti en éthène. Cet élément concorde d'ailleurs avec des travaux antérieurs réalisés avec la souche *D. ethenogenes* (51). Les cultures étant conservées en condition anaérobie, nous avons observé à plusieurs reprises les effets de la contamination par l'oxygène sur l'activité de déhalogénéation du PCE. L'oxygène a pour effet de diminuer l'activité de déchlorination des cultures et plus particulièrement la dernière étape de la déhalogénéation : VC → éthène. Dans un projet futur, il serait intéressant de pouvoir déterminer l'effet de l'oxygène avec une approche différente en déterminant par exemple les changements qui s'opèrent au



niveau de la communauté bactérienne comme la proportion des bactéries présentes ou l'expression de certains enzymes responsables de la déhalogénéation du PCE.

Trois montages différents ont aussi été testés pendant ce projet. Le premier montage nous permettait de faire des microcapsules par atomisation avec jet d'air mais il s'est avéré peu efficace en raison de la perte d'environ 67% des constituants de la solution-mère pendant le processus. Le deuxième montage nous a permis de progresser davantage puisque nous avons pu obtenir des capsules d'une taille de 30  $\mu\text{m}$  à 160  $\mu\text{m}$  et procéder à des expériences d'encapsulation avec le consortium enrichi KB1. En utilisant *E. coli* comme modèle, nous avons obtenus des résultats nous permettant de croire que l'atomisation avec ultrasons avait des effets négatifs sur la survie des cellules. Grâce à deux indices, concentration de protéines et unités de formation de colonies, nous avons estimé la survie des cellules entre 70% et 100%. Cependant, la comparaison des profils de déhalogénéation du PCE a révélé que ce processus d'encapsulation avait des effets sur l'activité de déchloration complète du PCE. L'effet principal fut l'arrêt quasi-total de la conversion  $\text{VC} \rightarrow \text{éthène}$ . Le troisième montage, l'encapsulation « drop-wise » est celui qui nous a permis d'atteindre notre objectif puisque nous avons pu encapsuler le consortium KB1 et obtenir une déhalogénéation complète du PCE. Les profils ont révélés des tendances intéressantes comme une activité de déchloration accrue avec les cellules encapsulées puisque la vitesse apparente d'accumulation d'éthène dans les échantillons était plus grande et la concentration maximale des intermédiaires DCE et VC était plus faible. Puisque la principale difficulté rencontrée dans les expériences avec les cellules fut la contamination par l'oxygène, nous avons testé l'effet de l'encapsulation sur des cellules exposées à différentes concentrations du contaminant. Les cellules immobilisées dans les capsules semblent avoir bénéficié d'un effet protecteur et elles ont ainsi pu continuer à convertir complètement le PCE en éthène même aux plus hauts niveaux de contamination.

Finalement, ce projet a été réalisé dans le but d'obtenir un modèle qui pourrait être utilisé dans des applications en biorémediation et nous croyons que l'encapsulation de la culture KB1 avec le troisième montage offre plusieurs avantages. Premièrement, les polymères utilisés (alginate, chitosane, lignosulfonate) proviennent de sources facilement renouvelables et le montage peut

être reproduit plusieurs fois pour obtenir une capacité de production des billes à grande échelle. Deuxièmement, les cellules encapsulées semblent conserver une activité de déchlorination comparable voire même supérieure aux cellules libres. La faible accumulation des intermédiaires chlorés DCE et VC était un élément important de l'activité de déchlorination des cellules encapsulées: l'environnement où se faisait la déhalogénéation serait moins exposés à des intermédiaires qui sont connus comme étant plus toxiques pour les animaux et les humains que le PCE présent au départ. Troisièmement, les cellules contenues dans les capsules conservaient une activité de déhalogénéation complète du PCE en présence de faibles concentrations d'oxygène et nous pensons que cet effet protecteur combiné aux nombreux effets protecteurs rapportés par d'autres équipes favoriserait la survie des cellules dans les conditions difficiles des sites contaminés par le PCE. Le modèle d'encapsulation développé dans le cadre de ce projet représenterait donc une progression vers une application en biorémédiation des sols contaminés par les éthènes chlorés.

## Bibliographie

1. Abelson, P.H. (1990) Incorporation of new science into risk assessment. *Science* **250**:1497.
2. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for tetrachloroethylene. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, ATSDR; 1992.
3. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for tetrachloroethylene. US Department of Health and Human Services, Public Health Service; 1997.
4. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for trichloroethylene. US Department of Health and Human Services, Public Health Service; 1997.
5. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological Profile for 1,1-Dichloroethene. (Update). Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA. 1994.
6. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxixological Profile for Vinyl Chloride (Update). Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA. 1992.
7. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxixological Profile for Vinyl Chloride (Update). Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA. 1997.
8. Autian, J. (1980). Plastics, p. 531-556. *In* J. Doull, C. D. Klaassen, and M. O. Amdur (ed.), Casarett and Doull's toxicology. Macmillan Publishing Co., Inc., New York.
9. Bégin F, Castaigne, F, Goulet, J. (1991). Production of alginate beads by a rotative atomizer. *Biotechnol Tech* **5** : 459–464.

10. Bleecker, A.B., Kende, H. (2000) Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **16**: 1-18.
11. Blume, T., Neis, U., (2004). Improved wastewater disinfection by ultrasonic pre-treatment. *Ultrasonic Sonochemistry*. **11**: 333-336.
12. Bonnard, N., Brondeau, M.T., Falcy, M., Protois, J.C., Schneider, O., Serre, P. (2002) Trichloroéthène. Services techniques et médicaux de l'INRS. Fiche toxicologique N°22.
13. Bonnard, N., Brondeau, M.T., Falcy, M., Protois, J.C., Schneider, O., Serre, P. (2004) Tétrachloroéthène. Services techniques et médicaux de l'INRS. Fiche toxicologique N°29.
14. Bonnard, N. Brondeau, M.T., Lafon, D., Protois, J.C., Schneider, O. (2004). 1,2-Dichloroéthène. Institut National de Recherche et de Sécurité, Fiche toxicologique N°79.
15. Bruschi, M.L., Cardoso, M.L.C., Lucchesi, M.B., Gremiao, M.P.D. (2003) Gelatin microparticles containing propolis obtained by spray-drying technique: preparation and characterisation. *Int. J. Pharmaceutics*, **264**: 45-55.
16. Claudino, M.J.C., Soares, D., Van Keulen, F., Marques, M.P.C., Cabral, J.M.S., Fernandes, P. (2008) Immobilization of mycobacterial cells onto silicone: Assessing the feasibility of the immobilized biocatalyst in the production of androstenedione from sitosterol. *Bioresource Technology*, **99**: 2304-2311.
17. Chang L.W., Lee, H.Y., Heng, P.W.S. (2002). Production of alginate microspheres by internal gelation using an emulsification method. *Inter. Journal of Pharmaceutics*. **242**: 259-262.
18. Chang, P.L. (1999). Encapsulation fo Somatic Gene Therapy. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **18**:146-158
19. Chang, T.M.S. (1999). Artificial cells, encapsulation and immobilization. *Annals NY Academy of Sciences*. **875**: 71-83.
20. Coppi, G., *et al.* (2001). Chitosan-Alginate Microparticles as a Protein Carrier. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. **27**: 393-400.

21. DiStefano, T.D., Gosset, J.M., Zinder, H. (1991). Reductive dechlorination of high concentrations of tetrachloroethene to ethene by an anaerobic enrichment culture in the absence of methanogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2287-2292.
22. Ellis, D.E., Lutz, E.J., Odom, J.M., Buchanan Jr. R.J., Bartlett, C.L., Lee, M.D. (2000). Bioaugmentation for accelerated in situ anaerobic bioremediation. *Environ. Sci. Technol.* **34**: 2254-2260.
23. Esquisabel, A., Hernandez, R.M., Igartua, M., Gascón, A.R., Calvo, B., Pedraz, J.L. (2002) Preparation and stability of agarose microcapsules containing BCG. *J. Microencapsul.*, **2**: 237-244.
24. Fetzner, S., Lingens, F. (1994) Bacterial dehalogenases: biochemistry, genetics, and biotechnological applications. *Microbiol. Rev.* **58**: 641-685.
25. Fetzner, S. (1998) Bacterial dehalogenation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**: 633-657
26. Filipovic-Grcic, J., Perisutti, B., Moneghini, M., Voinovich, D., Martinac, A., Jalsenjak, I. (2003) Spray-dried carbamezepine-loaded chitosan and HPMC microspheres: preparation and characterisation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **55**: 921-931.
27. Freedman, D.L., Gossett, J.M. (1989) Biological Reductive Dechlorination of Tetrachloroethylene and Trichloroethylene to Ethylene under Methanogenic Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: p.2144-2151.
28. Fung, J.M., Morris, R.M., Adrian, L., Zinder, S.H. (2007) Expression of reductive dehalogenase genes in *Dehalococcoides ethenogenes* strain 195 growing on tetrachloroethene, trichloroethene, or 2,3-dichlorophenol. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 4439-4445.
29. Gerritse, J., Renard, V., Visser, J., Gottschal, J.C. (1995) Complete degradation of tetrachloroethene by combining anaerobic dechlorinating and aerobic methanotrophic enrichment cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**: 920-928.

30. Gribble, G.W. (1994) The natural production of chlorinated compounds. *Environ. Sci. Technol* **28**: 310A-319A.
31. Hawley, G.G. (1981) *The Condensed Chemical Dictionary*. 10th ed. New York: Van Nostrand Reinhold Co., p.1041-1042.
32. He, J., Ritalahti, K.M., Aiello, M.R., Löffler, F.E. (2002) Complete Detoxification of Vinyl Chloride by an Anaerobic Enrichment Culture and Identification of the Reductively Dechlorinating Population as a Dehalococcoides Species. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**: 996-1003.
33. Hickman, J.C. (1993) Tetrachloroethylene, p.50-59. *In* J.I. Kroschwits and M. Howe-Grant (ed.), *Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology*, 4<sup>th</sup> ed., vol.6. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.
34. Holliger, C., Wohlfarth, G., Diekert, G. (1998) Reductive dechlorination in the energy metabolism of anaerobic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. **22**:383-398.
35. Hsieh, H-J., Liu, P-C., Liao, W-J. (2000) Immobilization of invertase via carbohydrate moiety on chitosan to enhance its thermal stability. *Biotechnol. Lett.* **22**: 1459-1464.
36. Jani, P.U., McCarthy, D.E., Florence, A.T. (1992). Nanosphere and Microsphere Uptake via Peyer's Patches : Observations of the Rate of Uptake in the Rat After a Single Oral Dose. *Int. J. Pharm*, **86**: 239-246.
37. Kailasapathy, K. (2002). Microencapsulation of probiotic bacteria : technology and potential applications. *Curr. Issues Interest. Microbiol.* **2**: 39-48.
38. Krajewska, B. (2004) Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, **35**: 126-139.
39. Lengsfeld, C.S., Manning, M.C., Randolph, T.W. (2002). Encapsulating DNA within biodegradable polymeric microparticles. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **3**: 227-235.

40. Lian, W-C., Hsiao, H-C., Chou, C-C. (2003). Viability of microencapsulated *bifidobacteria* in simulated gastric juice and bile solution. *Int. Journal of Food Microbiol.* **86**: 293-301.
41. Lyew D., Guiot S. (2003) Effects of aeration and organic loading rates on degradation of trichloroethylene in a methanogenic-methanotrophic coupled reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61**: 206-213.
42. Magnuson, J.K., Stern, R.V., Gossett, J.M., Zinder, S.H., Burris, D.R. (1998) Reductive Dechlorination of Tetrachloroethene to Ethene by a Two-Component Enzyme Pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1270-1275.
43. Magnuson, J.K., Romine, M.F., Burris, D.R., Kingsley, M.T. (2000) Trichloroethene Reductive Dehalogenase from *Dehalococcoides ethenogenes*: Sequence of *tceA* and Substrate Range Characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 5141-5147.
44. Maillard, J., Schumacher, W., Vazquez, F., Regard, C., Hagen, W.R., Holliger, C. (2003). Characterization of the Corrinoid Iron-Sulfur Protein Tetrachloroethene Reductive Dehalogenase of *Dehalobacter restrictus*. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 4628-4638.
45. Majeti, N.V., Ravi, K. (2000) A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*, **46**: 1-27.
46. Major, D.W., McMaster, M.L., Cox, E.E., Edwards, E.A., Dworatzek, S.M., Hendrickson, E.R., Starr, M.G., Payne, J.A., Buonamici, L.W. (2002). Field demonstration of successful bioaugmentation to achieve dechlorination of tetrachloroethene to ethene. *Environ. Sci. Technol.* **36**: 5106-5116.
47. Mars, A.E., Prins, G.T., Wietzes, P., de Koning, W., Janssen, D.B. (1998) Effect of trichloroethylene on the competitive behavior of toluene-degrading bacteria. *Appl Environ Microbiol.* **64**: 208-215.

48. Martínez-Romero, D. *et al.* (2007) Tools to Maintain Postharvest Fruit and Vegetable Quality through the Inhibition of Ethylene Action: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **47**:543–560
49. Maymó-Gatell, X., Tandoi, V., Gossett, J.M., Zinder, S.H. (1995). Characterization of an H<sub>2</sub>-Utilizaing Enrichment Culture That Reductively Dechlorinates Tetrachloroethene to Vinyl Chloride and Ethene in the Absence of Methanogenesis and Acetogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3928-3933
50. Maymó-Gatell, X., Chien, Y-t., Gossett, J.M., Zinder, S.H. (1997). Isolation of a Bacterium That Reductively Dechlorinates Tetrachloroethene to Ethene. *Science*. **276**: 1568-1571.
51. Maymó-Gatell, X., Anguish, T., Zinder, S.H. (1999) Reductive Dechlorination of Chlorinated Ethenes and 1,2-Dichloroethane by “*Dehalococcoides ethenogenes*” 195. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3108-3113.
52. Maymó-Gatell, X., Nijenhuis, I., Zinder, S.H. (2001) Reductive Dechlorination of *cis*-1,2-Dichloroethene and Vinyl Chloride by “*Dehalococcoides ethenogenes*”. *Environ. Sci. Technol.* **35**: 516-521.
53. McCarty, P.L., Semprini, L. (1994) Ground-water treatment for chlorinated solvents . In: Norris, R.D., Ed. *Handbook of bioremediation*. Boca Raton. FL: Lewis Publishers, pp. 87-116.
54. Miguez, C.B., Shen, C.F., Bourque, D., Guiot, S.R., Groleau, D. (1999) Monitoring Mehtanotrophic Bacteria in Hybrid Anaerobic-Aerobic Reactors with PCR and a catabolic Gene Probe. *Appl Environ Microbiol* **65**: 381-388.
55. Miyauchi, K., Suh, S.K., Nagata, Y., Yakagi, M. (1998) Cloning and sequencing of a 2,5-dichlorohydroquinone reductive dehalogenase gene whose product is involved in degradation of gamma-hexachlorocyclohexane by *Sphingomonas paucimobilis*. *J. Bacteriol.* **180**: 1354-1359.
56. Moslemy, P., Guiot, S.R., Neufeld, R.J. (2001). Production of size-controlled gellan gum microbeads encapsulating gasoline-degrading bacteria. *Enzyme and Microbial Technology* **30**: 10-18.



57. Moslemy, P., Neufeld, R.J., Guiot, S.R. (2002). Biodegradation of gasoline by Gellan Gum-Encapsulated Bacterial Cells. *Biotechnology and Bioengineering*. **80**: 175-184.
58. Moslemy, P., Neufeld, R.J., Guiot, S.R. (2004). Activated sludge encapsulation in gellan gum microbeads for gasoline biodegradation. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **26**: 197–204.
59. Mundt, K.A., Birk, T., Burch, M.T. (2003) Critical review of the epidemiological literature on occupational exposure to perchloroethylene and cancer. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*. **76** : 473-491.
60. Nagata, Y., Hatta, T., Imai, R., Kimbara, K., Fukuda, M., Yano, K., Takagi, M. (1993). Purification and characterization of c-hexa-chlorocyclohexane (c-HCH) dehydrochlorinase (LinA) from *Pseudomonas paucimobilis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**: 1582-1583.
61. Neumann, A., Wohlfarth, G., Diekert, G. (1996). Purification and characterization of tetrachloroethene reductive dehalogenase from *Dehalospirillum multivorans*. *J Biol. Chem.* **271**: 16515-16519.
62. Nex, F. (2004). Modelisation numérique de la biodegradation des composés organo-chlorés dans les aquifères fondée sur des expérimentations *in situ*. Le cas des chloroéthènes. Thèse de Doctorat. Université Louis Pasteur Strasbourg.
63. Orive, G., Hernández, R.M., Gascón, A.R., Calafiore, R., Chang, T.M.S., de Vos, P., Hortelano, G., Hunkeler, D., Lacik, I., Pedraz, J.L. (2003). History, challenges and perspectives of cell encapsulation. *TRENDS in Biotechnology*. **22** : 87-92.
64. Oyrton, A.C, Monteiro, Jr., Caludio, A. (1999) Some studies of cross-linking chitosan-glutaraldehyde interaction in a homogeneous system. *Int. Journal of Biological Macromolecules*, **26**: 119-128.
65. Park, J.K., Chang, H.N. (2000). Microencapsulation of microbial cells. *Biotechnology Advances*. **18**: 303-319.

66. Piyasena, P., Mohareb, E., McKellar, R.C. (2003). Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *Intern. J. Food Microbiol.* **87** : 207-216.
67. Rekha, S *et al.* (2005) Genome Sequence of the PCE-Dechlorinating Bacterium *Dehalococcoides ethenogenes*. *Science*. **307**: 105-108.
68. Peterson, R.V., Pitt, W.G. (2000). The effect of frequency and power density on the ultrasonic-enhanced killing of biofilm-sequestered *Escherichia coli*. *Colloids and Surface B: Biointerfaces*. **17**: 219-227.
69. Russo, R., Malinconico, M., Santagata, G. (2007). Effect of Cross-Linking with Calcium Ions on the Physical Properties of Alginate Films. *Biomacromolecules*. **8**: 3193-3197.
70. Ruth, M., Davidsdottir, B., Amato, A. (2004). Climate change policies and capital vintage effects: the cases of US pulp and paper, iron and steel, and ethylene. *Journal of Environmental Management*. **70**: 235-252.
71. Seifert, D.B., Phillips, J.A. (1997). Production of small, monodispersed alginate beads for cell immobilization. *Biotechnol. Prog.* **13**: 562–568.
72. Serp, D., Cantana, E., Heinzen, C., von Stockar, W., Marison, W. (2000) Characterization of an Encapsulation Device for the Production of Monodisperse Alginate Beads for Cell Immobilization. *Biotechnology and bioengineering*. **70**: 41-53.
73. Shim, H., Ryoo, D., Barbiere, P., Wood, T.K. (2001) Aerobic degradation of mixtures of tetrachloroethylene, trichloroethylene, dichloroethylenes, and vinyl chloride by toluene-o-xylene monooxygenase of *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **56**: 265-269.
74. Streitenberger, S.A., Villaverde, M.J., Sánchez-Ferrer, Á., García-Carmona, F. (2002). Microencapsulation of *Aerococcus viridans* with catalase and its application for the synthesis of dihydroacetone phosphate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**: 73-76.

75. Sung, Y., Ritalahti, K.M., Sanford, R.A., Urbance, J.W., Flynn, S.J., Tiedje, J.M., Löffler, F.E. (2003). Characterization of Two Tetrachloroethene-Reducing, Acetate-Oxidizing Anaerobic Bacteria and Their Description as *Desulfuromonas michiganensis* sp. nov. Appl. Environ. Microbiol. **69**: 2964-2974.
76. Tartakovsky, B., Petti, L., Hawari, J., Guiot, S.R. (1998). Immobilization of anaerobic sludge using chitosan crosslinked with lignosulfonate. J. of Industrial Microbiology & Biotechnology **20**: 45-47.
77. Teotia, S., Lata, R., Khare, S.K., Gupta, M.N. (2001). One-step purification of glucoamylase by affinity precipitation with alginate. Journal of molecular recognition. **14**: 295-299.
78. Traunecker, J., Preuß, A., Diekert, G. (1991). Isolation and characterization of a methyl chloride utilizing, strictly anaerobic bacterium. Arch. Microbiol. **156**: 416-421.
79. U.S. Environmental Protection Agency. Health Effects Assessment Summary Tables. FY1997 Update. Environmental Criteria and Assessment Office, Office of Health and Environmental Assessment, Office of Research and Development, Cincinnati, OH. 1997.
80. U.S. Environmental Protection Agency (2000). "Vinylidene Chloride (1,1-Dichloroethylene). <http://www.epa.gov/ttn/atw/hlthef/di-ethyl.html>, janvier 2000.
81. Van Eekert MHA, Schröder, T.J., Van Rhee, A., Stams, A.J.M., Schraa, G., Field, J.A. (2001). Constitutive dechlorination of chlorinated ethenes by a methanol degrading methanogenic consortium. Bioresource Technology **77**: 163-170.
82. Vogel, T.M., McCarty, P.L. (1985). Biotransformation of tetrachloroethylene to trichloroethylene, dichloroethylene. Vinyl chloride, and carbon dioxide under methanogenic conditions. Appl. Environ. Microbiol. **49**: 1080-1083.
83. Vogel, T.M., McCarty, P.L. (1987). Abiotic and biotic transformations of 1,1,1-trichloroethane under methanogenic conditions. Environmental science & technology. **21**: 1208-1213.

84. Wang, K.L., Li H., Ecker, J.R. (2002). Ethylene biosynthesis and signaling network. *Plant Cell*. **14** Suppl: S131-S151.
85. Westrick J.J., Mello, J.W., Thomas, R.F. (1984). The groundwater supply survey. *J. Amer. Water. Works. Assoc.* **76**: 52-59.
86. Wolk, C.P., Ernst, A., Elhai, J. (1994). Heterocyst metabolism and development, *In The Molecular Biology of Cyanobacteria* (Bryant, D.A., ed.) pp. 769-823, Kluwer.
87. Wong, E.W., Ambler, C.P., Baker, W.J., Parks, J.C. (1992). Produce high purity VCM product. *Hydrocarbon-Processing*. **71**: 129-134.
88. Zengler, K., Toledo, G., Rappé, M., Elkins, J., Mathur, E.J., Short, J.M., Keller, M. (2002). Cultivating the uncultured. *PNAS*. **99**: 15681-15686.
89. Zohar-Perez C., Chet I., Nussinovitch, A. (2004) Unexpected Distribution of Immobilized Microorganisms Within Alginate Beads. *Biotechnology and bioengineering*. **88**: 671-674
90. Hibiya, K., Nagai, J., Tsuneda, S., Hirata, A. (2004) Simple prediction of oxygen penetration depth in biofilms for wastewater treatment. *Biochem. Engin. J.* **19** : 61-68.

